



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL LENGKUAS (ALPINIA GALANGA) TERHADAP AKTIVITAS PROLIFERASI SEL ADENOKARSINOMA MAMMAMENCIT C3H

TESIS

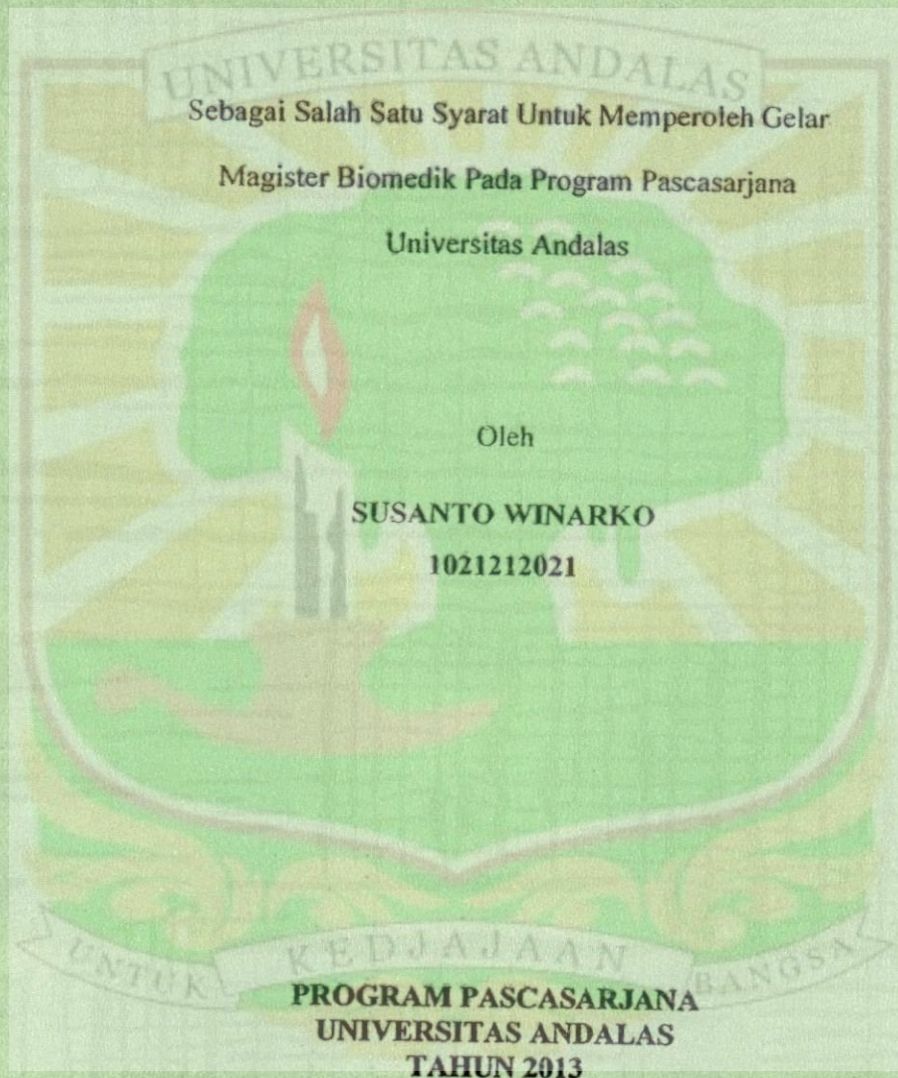


**SISANTO WINARKO
1021212021**

**PROGRAM
PASCASARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2013**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL LENGKUAS (ALPINIA
GALANGA) TERHADAP AKTIVITAS PROLIFERASI SEL
ADENOKARSINOMA MAMMA MENCIT C3H**

TESIS



LEMBAR PERSETUJUAN

Jenis Penelitian : Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Lengkuas Terhadap Aktivitas Proliferasi Sel Adenokarsinoma Mamma Mencit C3H

Nama Mahasiswa : Susanto Winarko

No BP : 1021212021

Program Studi : Ilmu Biomedik

Tesis ini telah diuji dan dipertahankan didepan Dewan Sidang Panitia

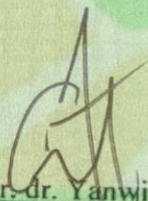
Akhir Magister Biomedik pada Program Pasca Sarjana Fakultas

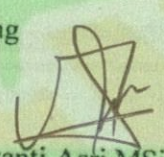
Kedokteran Universitas Andalas Padang

Tanggal 28 Maret 2013

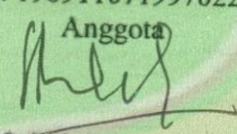
Menyetujui

Komisi Pembimbing

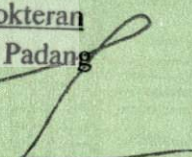

Prof. Dr. dr. Yanwirasti, PA
NIP. 194709301973032001
Ketua

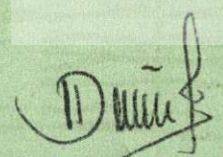

dr. Aswiyanti Asri, MSi. Med, SpPA
NIP. 196911071997022001


Anggota


Prof. dr. Salmiah Agus, Sp PA (K)
Anggota

Ketua Program Studi Ilmu Biomedik


Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Andalas Padang

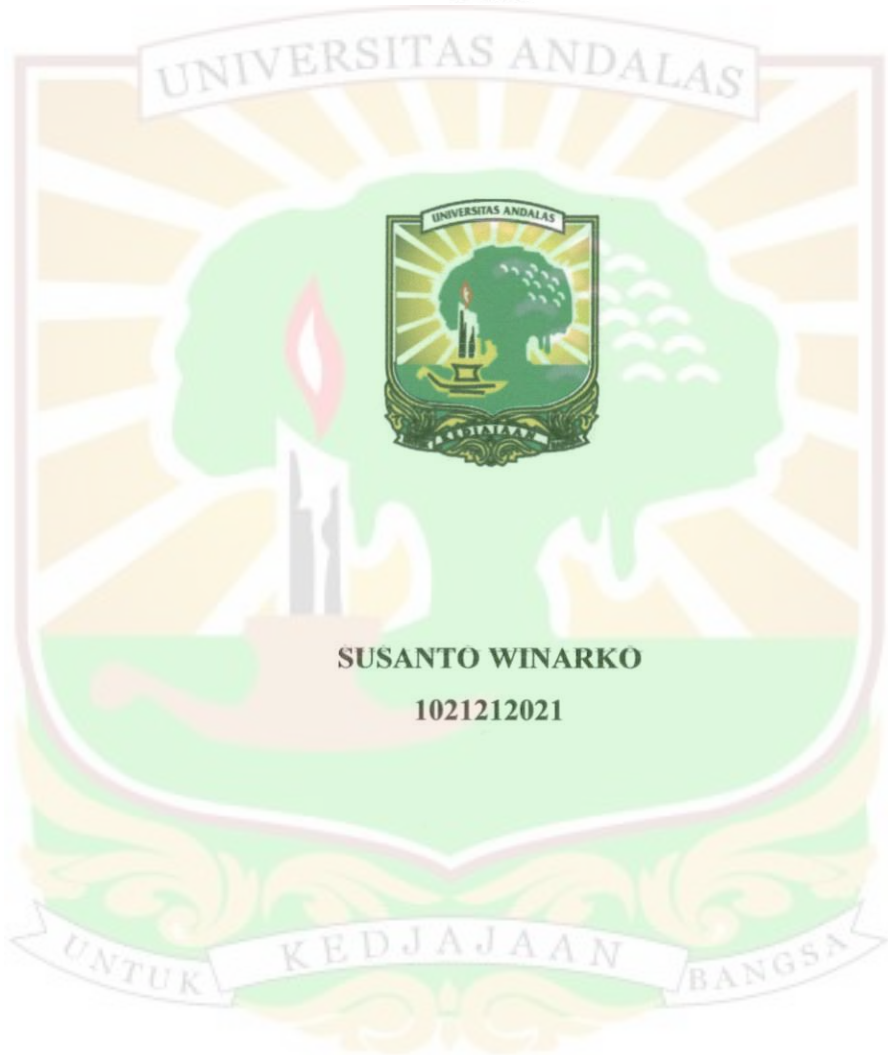

DR. dr. Delmi Sulastri, MS, SpGK
NIP. 196705101997022001


DR. dr. Masrul, MSc, SpGK
NIP. 195612261987101001



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL LENGKUAS (ALPINIA
GALANGA) TERHADAP AKTIVITAS PROLIFERASI SEL
ADENOKARSINOMA MAMMA MENCIT C3H**

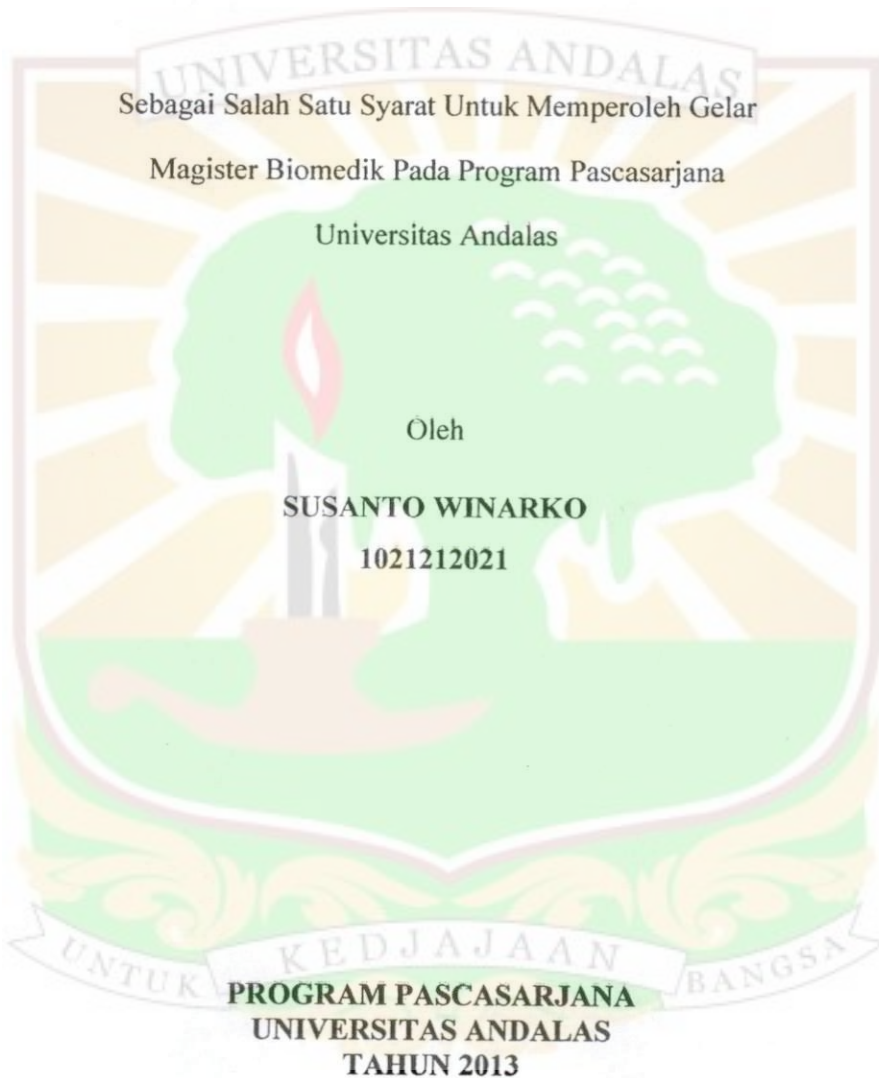
TESIS



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
TAHUN 2013**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL LENGKUAS (ALPINIA
GALANGA) TERHADAP AKTIVITAS PROLIFERASI SEL
ADENOKARSINOMA MAMMA MENCIT C3H**

TESIS



LEMBAR PERSETUJUAN

Jenis Penelitian : Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Lengkuas Terhadap Aktivitas Proliferasi Sel Adenokarsinoma Mamma Mencit C3H

Nama Mahasiswa : Susanto Winarko

No BP : 1021212021

Program Studi : Ilmu Biomedik

Tesis ini telah diuji dan dipertahankan didepan Dewan Sidang Panitia

Akhir Magister Biomedik pada Program Pasca Sarjana Fakultas

Kedokteran Universitas Andalas Padang

Tanggal 28 Maret 2013

Menyetujui

Komisi Pembimbing

Prof.Dr. dr. Yanwirasti, PA
NIP. 194709301973032001
Ketua

dr. Aswiyanti Asri,MSi.Med, SpPA
NIP. 196911071997022001
Anggota

Prof.dr. Salmiah Agus, Sp PA (K)
Anggota

Ketua Program Studi Ilmu Biomedik

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Andalas Padang

DR.dr. Delmi Sulastri, MS, SpGK
NIP. 196705101997022001

DR.dr. Masrul, MSc, SpGK
NIP. 195612261987101001

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa isi tesis yang saya tulis dengan judul “**Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Lengkuas Terhadap Aktivitas Proliferasi Sel Adenokarsinoma Mamma Mencit C3H**” adalah pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/ tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan didalam tulisan dan daftar pustaka. Jika dikemudian hari pernyataan ini tidak benar, maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya

Padang, Maret 2013

Susanto Winarko

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

N a m a : dr. Susanto Winarko
No BP : 1021212021
Tempat/Tanggal Lahir : Semarang, 17 Oktober 1965
Agama : Katholik
Alamat : Semarang Indah Blok C XX/10 Semarang

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Xaverius Semarang : Lulus tahun 1977
2. SMP Domenico Savio Semarang : Lulus tahun 1981
3. SMA Kebon Dalem Semarang : Lulus tahun 1984
4. FK Unissula Semarang : Lulus tahun 1992

C. Riwayat Pekerjaan

1. Dokter PTT Puskesmas Purwodadi Kabupaten Purworejo Jateng (1993-1996)
2. PT Becton Dickinson Asia Ltd (1997-2000)
3. Dokter Tetap RS Telogorejo Semarang (2000-sekarang)

D. Riwayat Keluarga:

1. Nama Orang Tua :
 - a. Ayah : Handoyo Winarko
 - b. Ibu : Indriati Winarko
2. Nama Istri : dr Nani Widjaja B H SpPA
3. Nama Anak
 1. Maria Aurelia Susanto
 2. Stefanus Andrew Susanto

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tesis dengan judul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Lengkuas (*Alpinia galanga*) Terhadap Aktivitas Proliferasi Sel Adenokarsinoma Mamma Mencit C3H”**.

Didalam menyelesaikan tulisan ini, penulis banyak mendapat bimbingan, arahan, dan sumbangan pikiran dari berbagai pihak, oleh sebab itu penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. DR.dr. Masrul, Msc. SpGK, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang
2. DR.dr. Delmi Sulastri, MS, SpGK, sebagai Ketua Program S2 Biomedik yang telah banyak memberikan masukan pada penulis
3. Prof.Dr.dr. Yanwirasti, PA(K) sebagai pembimbing utama yang telah memberi perhatian, masukan dan saran dalam penyusunan penelitian ini.
4. dr. Aswiyanti Asri, Msi.Med, Sp PA sebagai pembimbing yang telah banyak memberikan bimbingan, saran, masukan dalam penyusunan penelitian ini
5. Prof.dr.Salmiah Agus, Sp PA(K) sebagai pembimbing yang telah memberi perhatian, bimbingan serta menyediakan waktu dalam penyusunan penelitian ini
6. Prof.dr. Fadil Oenzil, PhD, SpGK, yang telah banyak memberi masukan yang sangat berguna dalam penyusunan penelitian ini

7. dr. R.Z. Nizar, SpPA (K), yang telah banyak memberi kesempatan dan bimbingan yang sangat berguna selama studi di Patologi Anatomi
8. dr. Noza Hilbertina, M.Biomed, SpPA, yang telah banyak membimbing , memberi saran dan masukan selama studi di Patologi Anatomi
9. dr. Tofrizal, M.Biomed, SpPA, yang telah meluangkan waktu dalam membimbing Tesis kami dalam imunohistokimia
10. dr. Yenita, M. Biomed, SpPA, yang telah memberikan dorongan dan masukan selama studi di Patologi Anatomi
11. dr. Henny Mulyani, M.Biomed. SpPA, yang telah banyak membimbing dan memberi semangat selama studi di Patologi Anatomi
12. Rekan-rekan sejawat PPDS Patologi Anatomi yang telah banyak memberikan semangat dan membantu dalam penyusunan Tesis ini
13. Semua pihak yang tidak dapat penulis ucapkan satu persatu
14. Istri kami tercinta dr Nani Widjaja, MSi.Med, SpPA beserta kedua anak saya Aurelia dan Andrew, yang telah memberi kesempatan ,semangat, pengorbanan dan pengertian selama saya studi

Penulis menyadari bahwa banyak kekurangan terdapat dalam penulisan penelitian ini, untuk itu penulis berharap adanya masukan, kritik dan saran dari berbagai pihak agar penelitian ini dapat menjadi lebih baik dan bermanfaat. Akhir kata penulis mengucapkan banyak terimakasih dan mohon maaf atas segala kesalahan dan kekhilafan, baik yang disengaja atau tidak disengaja .

Padang, Maret 2013

Penulis

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL LENGKUAS (*ALPINIA GALANGA*) TERHADAP AKTIVITAS PROLIFERASI SEL ADENOKARSINOMA MENCIT C3H

OLEH: SUSANTO WINARKO

RINGKASAN

PENDAHULUAN:

Data terakhir dari WHO tahun 2011 menyebutkan kematian akibat kanker payudara di Indonesia mencapai 20.052 atau 1,41 persen dari total kematian. Berdasarkan data histopatologi dari Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia pada tahun 2006, karsinoma payudara di Indonesia menempati urutan kedua sebanyak 2148 orang (14,28%) setelah karsinoma leher rahim. Di Padang sendiri jumlah penderita kanker payudara berada di urutan pertama dengan jumlah penderita sebanyak 232 orang.

Proliferasi sel adalah pembelahan sel (*cell division*) dan pertumbuhan sel (*cell growth*), yang mendasari mekanisme dan pengaturan proliferasi sel adalah siklus sel. Aktivitas proliferasi sel dapat dideteksi dengan menggunakan imunohistokimia Ki-67 yang akan mengekspresikan tiap fase pada siklus sel.

Lengkuas mengandung acetoxychavicol acetat yang merupakan senyawa yang bersifat antitumor. Lengkuas merupakan salah satu tanaman obat yang memiliki efek antiinflamasi dan memiliki jalur penghambatan pada NFκB sehingga menurunkan aktivitas proliferasi sel.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan apakah ada pengaruh pemberian ekstrak etanol lengkuas terhadap aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mamma mencit C3H dengan dosis yang bervariasi.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian *post test only controled design group*.

Tiga puluh dua ekor mencit betina strain C3H dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok Kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2), Perlakuan 3 (P3). Masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor mencit C3H, dan semua mencit dilakukan inokulasi sel tumor mamma. Setelah timbul tumor dilakukan terminasi mencit masing-masing 1 ekor setiap kelompok untuk memastikan adanya pertumbuhan tumor dengan menggunakan pemeriksaan histopatologi (HE). Selanjutnya Kelompok K diberi diet standar selama 2 minggu dan tidak mendapatkan perlakuan. P1 diberi diet standar, dan mendapat sonde ekstrak etanol lengkuas 225 mg/kgBB/hari selama 2 minggu. P2 diberi diet standar, mendapat sonde ekstrak etanol lengkuas merah 450 mg/kgBB/hari selama 2 minggu. P3 diberi diet standar, mendapat sonde ekstrak etanol lengkuas merah 675 mg/kgBB/hari selama 2 minggu. Setelah masa perlakuan berakhir, semua mencit diterminasi dan diambil jaringan tumor dan jaringan tumor diproses menjadi blok parafin, kemudian dibuat preparat untuk pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan HE. Selanjutnya dilakukan pengecatan imunohistokimia Ki-67.

Indeks proliferasi sel adenokarsinoma didapatkan dengan cara menggunakan *Allred Scoring* yaitu menjumlahkan *Intensity scoring* dan *Proportion scoring*, yaitu dengan menggunakan mikroskop cahaya menghitung jumlah sel yang

diekspresikan oleh Ki-67 berupa inti sel yang berwarna coklat, dan *scoring* dilakukan pada tiap-tiap slide sebanyak 5 kali lapangan pandang kuat (pembesaran 40x).

HASIL PENELITIAN

Dari hasil SPSS dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan Kolmogorov Smirnov, didapatkan hasil $p=0,690$ ($p>0,05$) sehingga dapat disimpulkan sebaran data normal, kemudian dilanjutkan dengan uji hipotesis parametrik *Oneway Anova*. Berdasarkan hasil uji *Oneway Anova* terdapat hasil perbedaan yang bermakna $p=0,001$ ($p<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan aktivitas proliferasi diantara kelompok penelitian. Hasil rerata aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mamma mencit yang tertinggi didapatkan pada kelompok Kontrol yaitu $5,00 \pm 0,25$, diikuti kelompok P1 dengan $3,45 \pm 0,47$, kemudian P2 dengan $3,20 \pm 0,86$ dan terendah adalah kelompok P3 dengan $2,22 \pm 0,69$.

Dari analisa test *Post Hoc Bonferroni* hasil aktivitas proliferasi yang bermakna terdapat pada kelompok Kontrol dengan P1 ($p=0,001$), kelompok Kontrol dengan P2 ($p=0,001$), kelompok Kontrol dengan P3 ($p=0,001$), kelompok P1 dengan kelompok P3 ($p=0,006$), kelompok P2 dengan kelompok P3 ($p=0,042$). Perbedaan yang tidak bermakna terdapat pada kelompok P1 dengan P2 ($p=1,000$).

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan mencit strain C3H karena jenis mencit ini memiliki kecenderungan untuk mendapat keganasan melalui kerentanan genetik dan transmisi virus MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*) melalui mammae sehingga mudah terjadi proses karsinogenesis. Dari hasil penelitian didapatkan rerata aktivitas proliferasi terjadi pada semua mencit, dimana aktivitas tertinggi didapatkan pada kelompok Kontrol, diikuti kelompok P1, kemudian P2 dan terendah pada kelompok P3. Sedangkan hasil pengujian antar kelompok didapatkan perbedaan yang bermakna diantara ke 4 kelompok percobaan ($p=0,001$). Aktivitas proliferasi yang bermakna terdapat antara kelompok Kontrol dengan P1, kelompok Kontrol dengan P2, kelompok Kontrol dengan P3, kelompok P1 dengan P3 dan kelompok P2 dengan P3. Sedangkan kelompok P1 dengan P2 tidak didapatkan perbedaan aktivitas proliferasi yang bermakna walaupun secara rerata terdapat penurunan aktivitas proliferasi.

Lengkuas dengan kandungan ACA memiliki peran menghambat NF κ B melalui jalur penghambatan regulator protein siklus sel yaitu Siklin D1 yang berakibat terjadinya hambatan transisi siklus sel dari fase G1 ke S, dengan demikian aktivitas proliferasi sel akan menurun dan sel tumor tidak tumbuh.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol lengkuas (*alpinia galanga*) dengan dosis 225mg/kgBB/hari dapat menghambat aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mencit C3H dan hasil yang terbaik didapatkan pada dosis 675mg/kgBB/hari

THE EFFECT OF ETHANOL EXTRACT OF LENGKUAS (ALPINIA GALANGA) ON THE CELL PROLIFERATION ACTIVITIES OF BREAST ADENOCARCINOMA C3H MICE

SUMMARY

BACKGROUND

Recent data from the WHO in 2011 mentions breast cancer deaths in Indonesia reached 20,052 or 1.41 percent of the total deaths. Based on data from the National Registration histopathological Cancer Pathology Association of Physician Specialists Indonesia in 2006, breast carcinoma Indonesia ranks second in as many as 2148 people (14.28%) after cervical carcinomas. In Padang number of breast cancer comes out first by the number of people with as many as 232 people.

Cell proliferation is cell division (cell division) and cell growth (cell growth), the underlying mechanism and regulation of cell proliferation is the cell cycle. Cell proliferation activity can be detected by using immunohistochemical Ki-67 that will express each phase of the cell cycle.

Lengkuas containing Acetoxychavicol acetate which is a compound that is antitumor. Lengkuas is one of the herbs that have anti-inflammatory effects and has inhibitory pathways in NF κ B thus decreasing cell proliferation activity.

This study aims to investigate whether there is the effect of the ethanol extract of lengkuas against breast adenocarcinoma cell proliferation activity of C3H mice with varying doses .

METHODS

This study was an experimental study using a post-test only research design controled design group. Thirty-two strains of C3H mice were divided into 4 groups: control group (K), Treatment 1 (P1), Treatment 2 (P2). Treatment 3 (P3). Each group consisted of 8 C3H mice, and all mice were inoculated with tumor cells mamma. Once the tumor arises then each group is taken 1 tail to be terminated to ensure the growth of tumors using histopathology (HE). Furthermore K group are given a standard diet for 2 weeks and did not get treatment. P1 are given a standard diet, and got sonde ethanol extract of lengkuas 225 mg / kgBW / day for 2 weeks. P2 are given a standard diet, got sonde ethanol extract of lengkuas 450 mg / kgBW / day for 2 weeks. P3 are given a standard diet, got sonde ethanol extract of lengkuas 675 mg / kgBW / day for 2 weeks. After the treatment period ended, all the mice were terminated and the tumor tissue was taken and processed tumor tissue into paraffin blocks, then made preparations for histopathological examination with HE staining. Then performed immunohistochemical staining Ki-67 .

Adenocarcinoma cell proliferation index obtained by using the Allred scoring with added Intensity and Proportion scoring, by using a light microscope counting the number of cells that expressed by Ki-67 in the form of cell nuclei stained brown, and the scoring is done on each of the slides as much as 5 times strong field of view (magnification 40x).

RESULTS

SPSS results of normality test data using the Kolmogorov Smirnov, showed $p = 0.690$ ($p > 0.05$) so that it can be concluded normal distribution of the data, followed by Oneway Anova parametric hypothesis test. Based on the results of Oneway Anova test results are significant differences $p = 0.001$ ($p < 0.05$) which means that there are differences between the proliferative activity of the research group. The mean activity of mice breast adenocarcinoma cell proliferation is the highest found in the control group 5.00 ± 0.25 , followed by P1 to 3.45 ± 0.47 , and 3.20 ± 0.86 P2 and P3 is the lowest group with 2.22 ± 0.69 .

From the analysis of Post Hoc Bonferroni test results are significant proliferative activity in the control group P1 ($p = 0.001$), with a control group P2 ($p = 0.001$), with P3 control group ($p = 0.001$), group P1 with P3 group ($p = 0.006$), group P2 with P3 group ($p = 0.042$). There is a significant difference in P1 with P2 group ($p = 1.000$).

DISCUSSION

This study uses a mouse strain C3H mice because this species has a tendency to get a malignancy through genetic susceptibility and transmission of virus MMTV (Mouse Mamary Tumor Virus) through so easily happen mammary carcinogenesis process. From the results, the mean proliferative activity occurred in all mice, with the highest activity obtained in the control group, followed by P1, then P2 and P3 the lowest in the group. While the test results between groups found significant differences among the 4 experimental groups ($p = 0.001$). Proliferation activities that are meaningful to the control group with P1, control group with P2, control group with P3, the group P1 with P3 and P2 with P3 group. Group P1 with P2 is not found significant differences in proliferative activity, although there is a decrease in the mean proliferative activity.

Lengkuas with ACA content has NF κ B inhibiting role through inhibition of cell cycle regulatory proteins are cyclins D1 transition that results in resistance of the cell cycle G1 to S phase, as such activity decreases cell proliferation and tumor cells did not grow.

CONCLUSION

Ethanol extract of lengkuas (*Alpinia galanga*) with 225mg/kgBW/day doses can inhibit the activity of C3H mouse adenocarcinoma cell proliferation and the best results obtained at doses 675mg/kgBW/day.

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL LENGKUAS (*ALPINIA GALANGA*) TERHADAP AKTIVITAS PROLIFERASI SEL ADENOKARSINOMA MENCIT C3H

Oleh: Susanto Winarko

ABSTRAK

Latar belakang

Berdasarkan data dari WHO tahun 2011 kematian akibat kanker payudara di Indonesia mencapai 20.052 dari total kematian. Permasalahan yang sering timbul pada masyarakat kita adalah biaya yang tidak terjangkau sehingga masyarakat banyak yang berpaling pada terapi alternatif. Salah satu terapi alternatif yang sering digunakan oleh masyarakat adalah penggunaan tanaman tradisional. Lengkuas (*Alpinia galanga* (L) Wild merupakan tanaman tradisional yang mengandung zat aktif *I-Acetoxychavicol acetate* (ACA), dimana pada beberapa penelitian terdahulu dapat dipergunakan sebagai anti kanker dengan menghambat aktifitas proliferasi sel. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak etanol lengkuas (*Alpinia galanga*) terhadap aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mamma pada mencit C3H.

Metode

Penelitian ini adalah *true experimental* menggunakan mencit C3H dengan rancangan penelitian *post test only controlled design group*. Penelitian ini menggunakan 32 ekor mencit C3H yang dibagi 4 kelompok yaitu kelompok Kontrol, Perlakuan1(P1), Perlakuan2(P2), Perlakuan3(P3), lalu diinokulasi dengan sel adenokarsinoma mamma, setelah itu pada kelompok perlakuan diberi ekstrak etanol lengkuas dosis bertingkat 225mg/kgBB/hari, 450mg/kgBB/hari dan 675mg/kgBB/hari selama 2 minggu. Setelah semua mencit diterminasi, dilakukan pemeriksaan proliferasi sel tumor menggunakan imunohistokimia Ki-67.

Hasil

Terdapat perbedaan aktivitas proliferasi yang bermakna ($p=0,000$) diantara keempat kelompok dengan menggunakan uji *Oneway Anova*. Pada analisa *post Hoc Bonferroni* didapatkan hasil aktivitas proliferasi yang paling bermakna terdapat antara kelompok Kontrol dengan P2($p=0,000$), Kontrol dengan P1($p=0,001$) dan kelompok P2 dengan P3 ($p=0,0042$)

Kesimpulan

Pemberian ekstrak etanol lengkuas dengan dosis 225mg/kgBB/hari sudah dapat menghambat aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mamma mencit C3H, dan hasil yang terbaik didapatkan pada dosis 675mg/kgBB/hari.

Kata kunci: *Alpinia galanga*, *I-Acetoxychavicol acetate*, proliferasi sel, Ki-67

THE EFFECT OF ETHANOL EXTRACT OF LENGKUAS (ALPINIA GALANGA) ON THE CELL PROLIFERATION ACTIVITIES OF BREAST ADENOCARCINOMA C3H MICE

BY: SUSANTO WINARKO

ABSTRACT

Background

According to data from the WHO in 2011 breast cancer deaths in Indonesia reached 20 052 of the total deaths. Problems that often arise in our communities is not affordable costs so many people are turning to alternative therapies. One alternative therapy that is often used by the public is use of traditional plants. Lengkuas (*Alpinia galanga* (L) Wild is a traditional plant containing the active substance I-Acetoxychavicol-Acetate (ACA), which in some previous studies may be used as anti-cancer activity by inhibiting cell proliferation. The aim of this study is to investigate the effect of the ethanol extract of Lengkuas (*Alpinia galanga*) on the cell proliferation activities of breast adenocarcinoma C3H mice.

Methods

This is a true experimental study using C3H mice with post-test only research design controlled group design. This study used 32 C3H mice were divided into 4 groups: control (K), Treatment1(P1), Treatment2(P2), Treatment3(P3), and then inoculated with breast adenocarcinoma cells, after that the treatment group given graded doses of ethanol extract of Lengkuas 225mg/kgBW/day, 450mg/kgBW/day and 675mg/kgBW/day for 2 weeks. After all mice were terminated, examination of tumor cell proliferation using Ki-67 immunohistochemistry.

Results

There were significant differences in proliferation activities ($p = 0.000$) among the four groups using Oneway Anova test. In the post hoc Bonferroni analysis of obtained results of the most significant proliferation activities exists between the P2 control group ($p = 0.000$), with P1 controls ($p = 0.001$) and group P2 to P3 ($p = 0.0042$)

Conclusion

Ethanol extract of lengkuas (*Alpinia galanga*) at a dose 225mg/kgBW/day can inhibit breast adenocarcinoma cell proliferation activity of C3H mice, and the best results be obtained at the doses 675mg/kgBW/day.

Keywords : *Alpinia galanga*, I-Acetoxychavicol Acetate, cell proliferation, Ki-67

DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DEPAN.....	i
LEMBAR SAMPUL DALAM PRASYARAT GELAR.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iv
DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
RINGKASAN	viii
ABSTRAK	xi
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
 BAB I: PENDAHULUAN.....	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
 BAB II: TINJAUAN PUSTAKA.....	 7
2.1 Proliferasi Sel.....	7
2.2 Siklus Sel	7
2.3 Kanker	10
2.4 Kanker Payudara	14
2.4.1 Struktur dan Fungsi Payudara	14
2.4.2 Insiden dan Epidemiologi	15
2.4.3 Etiologi.....	16
2.4.4 Faktor risiko Kanker Payudara.....	17
2.4.5 Patogenesis Kanker Payudara	18
2.4.6 Klasifikasi	20
2.5 Lengkuas (Alpinia Galanga).....	21
2.6 Mencit Strain C3H	28
2.6.1 Perkembangan dan Regresi Kelenjar Mamaria Mencit	 28

2.6.2 Histologi Kelenjar Mamaria Mencit.....	28
2.6.3 Pertumbuhan Tumor Pada Mencit.....	29
2.6.4 Transplantasi	29
2.6.5 Morfologi dan Biologi Tumor Mamaria Mencit ...	30
a. Makroskopis	30
b. Mikroskopis.....	30
2.6.6 Pembagian Histologi Tumor Mamaria Mencit.....	31
2.6.7 Mencit Jenis Pembawa MMTV.....	31
2.6.8 Proses Infeksi MMTV Pada Mencit	32
2.7 Ki-67.....	32
2.8 <i>Nuclear Factor Kappa B</i> (NF κ B)	34
BAB III: KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	
PENILAIAN	37
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	38
3.2 Hipotesis Penelitian	39
BAB IV: METODE PENELITIAN.....	40
4.1 Jenis Penelitian	40
4.2 Rancangan Penelitian	40
4.3 Populasi dan Sampel Penelitian	40
4.3.1 Populasi Penelitian.....	40
4.3.2 Sampel Penelitian	41
4.4 Besar Sampel.....	41
4.5 Variabel Penelitian	42
4.6 Definisi Operasional	42
4.7 Bahan dan Alat.....	44
4.7.1 Bahan	44
4.7.2 Alat.....	44
4.8 Tempat dan Waktu Penelitian	45
4.9 Kerangka Alur Penelitian.....	46
4.10 Prosedur Kerja.....	47
4.11 Analisa Data.....	48
4.12 Persetujuan Etik.....	49
BAB V: HASIL PENELITIAN.....	50
5.1 Inokulasi Sel Adenokarsinoma Mamma, Berat Badan dan Volume Tumor Mencit.....	50
5.2 Hasil Pemeriksaan Aktivitas Proliferasi Sel Tumor Dengan Imunohistokimia Ki-67.....	52
BAB VI: PEMBAHASAN.....	56
6.1 Inokulasi Tumor Mencit	56
6.2 Perlakuan Mencit Dengan Ekstrak Lengkuas	57
BAB VII: KESIMPULAN DAN SARAN.....	59
7.1 Kesimpulan	59
7.2 Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	60

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Rerata aktifitas proliferasi semua kelompok mencit...	53
Tabel 5.2 Aktivitas proliferasi mencit C3H setelah diberi ekstrak Etanol lengkuas pada masing-masing kelompok	54



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Siklus Sel.....	8
Gambar 2.2 Skema dasar molecular kanker.....	13
Gambar 2.3 Pohon dan Rimpang Lengkuas.....	23
Gambar 4.1 Allred scoring.....	43
Gambar 5.1 Pewarnaan HE (Hematoxyllin Eosin) tumor adeno Karsinoma mencit.....	51
Gambar 5.2 Perbandingan besar tumor mencit antar kelompok .	52
Gambar 5.3 Box Plot median aktifitas proliferasi mencit.....	53
Gambar 5.4 Imunohistokimia Ki-67 pada aktivitas proliferasi sel Adenokarsinoma.....	55



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Ethical Clearence	64
Lampiran 2: Surat Izin Pelaksanaan Penelitian (SIPP) di Universitas Indonesia.....	65
Lampiran 3: Surat Keterangan Penyediaan ekstrak lengkuas Di Undip.....	66
Lampiran 4: Inokulasi Sel Adenokarsinoma Mamma	67
Lampiran 5: Pembuatan Ekstrak Etanol Alpinia Galanga (rimpang lengkuas)	69
Lampiran 6: Penatalaksanaan Jaringan	70
Lampiran 7: Pewarnaan Jaringan dengan HE (Hematoksillin Eosin).....	71
Lampiran 8: Pewarnaan Proliferasi Sel dengan Ki-67.....	73
Lampiran 9: Hasil Analisa Statistik	75
Lampiran 10: Berat badan dan Volume tumor mencit C3H	79
Lampiran 11: Allred Scoring Ki-67 pada mencit	80



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyebab kematian nomor 7 (5,7%) setelah stroke, tuberkulosis, hipertensi, cedera perinatal dan diabetes melitus. Berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2007, kanker payudara menempati urutan pertama pada pasien rawat inap di seluruh RS di Indonesia (16,85%), disusul kanker leher rahim (11,78%). (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2012) Di Indonesia prevalensi tumor / kanker adalah 4,3 per 1000 penduduk. Data terakhir dari WHO tahun 2011 menyebutkan kematian akibat kanker payudara di Indonesia mencapai 20.052 atau 1,41 persen dari total kematian. (Ahmedin Jemal et al, 2011)

Berdasarkan data histopatologik dari Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia pada tahun 2006, karsinoma payudara di Indonesia menempati urutan kedua sebanyak 2148 orang (14,28%) setelah karsinoma leher rahim. Di Padang sendiri jumlah penderita kanker payudara berada di urutan pertama dengan jumlah penderita sebanyak 232 orang. (Badan Registrasi Kanker, 2006)

Dalam keadaan normal atau homeostasis maka pertumbuhan jaringan ditentukan oleh kecepatan proliferasi, diferensiasi dan apoptosis. Apabila tubuh mengalami gangguan seperti kanker maka kecepatan proliferasi, dan diferensiasi akan menjadi meningkat. (Kumar, 2010) Peningkatan jumlah sel dapat berasal

dari proliferasi yang meningkat atau penurunan dari kematian sel. Proliferasi sel dapat di stimulasi oleh kondisi fisiologis dan patologis. Stimulasi fisiologis dapat menjadi bertambah banyak, membentuk kondisi patologis. Proliferasi dari sel secara luas dikontrol oleh sinyal dari lingkungan mikro yang menstimulasi atau menghambat proliferasi seperti yang terjadi pada kanker payudara (Kumar, 2010).

Proliferasi sel adalah pembelahan sel (*cell division*) dan pertumbuhan sel (*cell growth*), yang mendasari mekanisme dan pengaturan proliferasi sel adalah siklus sel. Dalam keadaan normal siklus sel akan terkontrol dengan baik tetapi pada tumor atau keganasan, siklus sel akan mengalami disregulasi aktivitas siklin dan CDK (*Cycline Dependent Kinase*) sehingga memudahkan sel untuk berproliferasi. Aktivitas proliferasi sel dapat dideteksi dengan menggunakan imunohistokimia Ki-67 yang akan mengekspresikan tiap fase pada siklus sel (Kumar, 2010)

Penyebab kanker payudara masih belum banyak diketahui. Namun tiga faktor yang penting adalah : perubahan genetik, pengaruh hormonal dan faktor lingkungan. Faktor-faktor tersebut diatas menyebabkan terjadinya kerusakan pada tingkat DNA sehingga apabila tubuh tidak berhasil memperbaiki DNA maka akan terjadi mutasi pada gen-gen di DNA. Selanjutnya mutasi DNA akan menyebabkan beberapa perubahan pada tubuh, yaitu: pengaktifan onkogen yang berakibat terjadinya gangguan pada faktor pertumbuhan sehingga menyebabkan terjadinya disregulasi siklus sel dan merangsang sel normal untuk berproliferasi, gangguan pada tumor supresor gen sehingga gen ini tidak dapat menjalankan fungsinya sebagai gen pengendali pertumbuhan, serta adanya perubahan pada pengaturan apoptosis. Akibat dari perubahan tersebut diatas maka pada tubuh

akan terjadi proliferasi sel yang tidak terkontrol yang menyebabkan pertumbuhan sel tumor, dan pada akhirnya lama kelamaan sel tumor tersebut akan menjadi tumor ganas.

Pengobatan kanker payudara secara medis yang dapat dilakukan adalah operasi, radioterapi, kemoterapi atau kombinasi dari ketiganya. Permasalahan yang sering timbul pada masyarakat kita adalah biaya yang tidak terjangkau untuk pengobatan kanker payudara. Oleh sebab itu banyak masyarakat yang menderita kanker payudara mencoba mencari terapi alternatif dalam pengobatan kanker payudara. Tanaman Obat tradisional seringkali dipergunakan sebagai salah satu alternatif obat yang banyak dipercaya orang dapat membantu proses penyembuhan, selain harga yang murah, mudah didapatkan, tanaman obat tradisional mempunyai efek samping yang lebih sedikit dibandingkan obat medis.

Akhir-akhir ini upaya pengobatan kanker dengan kemoterapi banyak dilakukan. Bahan kemoterapi dari tumbuhan mempunyai prospek sebagai penghambat kanker yang lebih sedikit efek sampingnya. Distribusi senyawa fitokimia yang memiliki aktivitas antikanker sangat luas dalam tumbuh-tumbuhan. NCI (*National Cancer Institute*) melakukan skrining sekitar 114.000 ekstrak tumbuhan dari tahun 1960 sampai 1982 dan menemukan sekitar 35.000 sampel tumbuhan memiliki aktivitas antikanker. Tahun 1991 sekitar 28.000 sampel tumbuhan dari seluruh dunia telah dikoleksi karena memiliki aktivitas antikanker. Sekitar 62% dari 87 jenis obat antikanker berasal dari bahan alam (Cragg et al, 1993).

Beberapa tumbuhan memiliki komponen antitumor berupa senyawa fitokimia yang dikenal dengan pencegah kanker (*cancer chemoprevention*). Senyawa antitumor dan antikanker pada tanaman diantaranya yang telah dikenal luas oleh masyarakat adalah lengkuas (*Alpinia galanga* (L) wild). Lengkuas merupakan tanaman tradisional yang mudah didapatkan di Indonesia dan seringkali digunakan sehari-hari sebagai bumbu penyedap masakan atau rempah. Beberapa zat bioaktif yang terkandung didalamnya antara lain : flavonoid, terpenoid, dan fenol, phenylpropanoid . Golongan senyawa ini sering dipergunakan sebagai bahan dasar obat modern. Sebagai contoh senyawa phenylpropanoid, acetoxychavicol acetat merupakan senyawa yang bersifat antitumor dari tumbuhan lengkuas (Chudiwal, 2010). Selain dipergunakan sebagai penyedap makanan, lengkuas sering digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati gangguan lambung, menghilangkan kembung, anti jamur, menghilangkan gatal, menambah nafsu makan, dan sakit tenggorokan (Erna Sinaga, 2000)

Sebagian besar dari mediator utama pertumbuhan tumor adalah inflamasi kronik, dan NF κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) merupakan salah satu faktor transkripsi inflamasi utama yang berperan dalam pengaturan dari beberapa perkembangan sel tumor. NF κ B merupakan target terapi dari beberapa tanaman obat dan juga ditemukan pada jaringan tumor . Lengkuas merupakan salah satu tanaman obat yang memiliki efek antiinflamasi dan memiliki jalur penghambatan pada NF κ B sehingga menurunkan aktivitas proliferasi sel (Gautam Sethi et al, 2008, Shishir Shisodia 2004, Bharat B. Aggarwal, 2006)

Berdasarkan beberapa penelitian yang terdahulu lengkuas mengandung zat aktif *I-Acetoxychavicol Acetat* (ACA) yang diduga dapat dipergunakan sebagai anti kanker, anti inflamasi, dan menghambat aktivitas proliferasi. Rusmarilin pada tahun 2003 membuktikan ekstrak etil asetat lengkuas menghambat proliferasi sel kanker dalam kultur baik menggunakan alur sel kanker maupun sel kanker primer manusia. Penghambatan proliferasi sel kanker diukur berdasarkan jumlah sel yang hidup dalam kultur dengan hemositometer. Ekstrak etil asetat lengkuas 100µg/ml menghambat 100% proliferasi sel kanker paru dan pada konsentrasi 50ug/ml terjadi penghambatan terendah 95%. Pada konsentrasi 200µg/ml terjadi penghambatan tertinggi pada sel kanker primer dari kanker ovarium adenokarsinoma papilar serosa sebesar 76,36%. Pada penelitian mencit yang ditransplantasi dengan sel kanker mamma , memberikan gambaran makroskopis dan mikroskopis lebih baik pada dosis 750mg/kgBB. Uji toksisitas *invivo* perhitungan LD50 pada konsentrasi 765mg/kgBB.

Penelitian oleh Lee and Houghton tahun 2005 dan peneliti lain Chudiwal et al tahun 2010 menunjukkan bahwa kandungan lengkuas *I -Acetoxychavicol acetate* mempunyai aktivitas anti kanker yang menunjukkan aktivitas sitotoksik yang signifikan setelah paparan 48 jam terhadap MCF7 (*Michigan Cancer Foundation* 7)/kanker payudara, sel COR L23 (kanker paru) dengan IC50 7,8µM dan 23,9µM.

Berdasarkan hal tersebut diatas maka kami tertarik untuk melakukan penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol lengkuas terhadap aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma payudara. Aktivitas proliferasi sel dinilai dengan pengecatan Ki67, yang akan mengekspresikan sel yang berproliferasi pada fase

G1,S,G2 dan M , kemudian dilakukan penghitungan dengan menggunakan *Allred scoring* (Craig Allred, 2009).

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang masalah, dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut:

Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak etanol lengkuas (*Alpinia galanga*) terhadap aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mamma mencit C3H ?

1.3 Tujuan penelitian

Untuk membuktikan adanya pengaruh ekstrak etanol lengkuas (*Alpinia galanga*) terhadap aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mamma mencit C3H dengan berbagai tingkat dosis (225mg/kgBB/hari, 475mg/kgBB/hari dan 675mg/kgBB/hari)

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Ilmu Pengetahuan

Untuk menambah pemahaman tentang manfaat ekstrak etanol lengkuas pada adenokarsinoma mamma

1.4.2 Masyarakat

Untuk memberikan pengetahuan tentang salah satu manfaat tanaman tradisional lengkuas sebagai terapi tambahan kanker payudara

1.4.3 Pengambil keputusan

Sebagai informasi ilmiah yang dapat dipakai menjadi salah satu acuan dalam penentuan kebijakan kesehatan masyarakat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Proliferasi Sel

Pada jaringan orang dewasa , populasi sel ditentukan oleh proliferasi sel, diferensiasi dan kematian oleh apoptosis, dimana peningkatan daripada jumlah sel merupakan hasil dari peningkatan proliferasi atau penurunan kematian sel. Proliferasi sel dapat distimulasi melalui kondisi fisiologis dan patologis. Stimulasi fisiologis dapat menjadi meningkat dan menimbulkan kondisi patologis. Proliferasi sel secara umum dikontrol oleh sinyal dari lingkungan mikro yang menstimulasi atau menurunkan penghambatan pertumbuhan, dan pada kasus kanker merupakan pertumbuhan yang tidak terkontrol. Proliferasi sel sangat berhubungan erat dengan proses regulasi yang melibatkan siklus sel dalam hubungannya dengan kanker. (Kumar, 2010)

2.2 Siklus Sel:

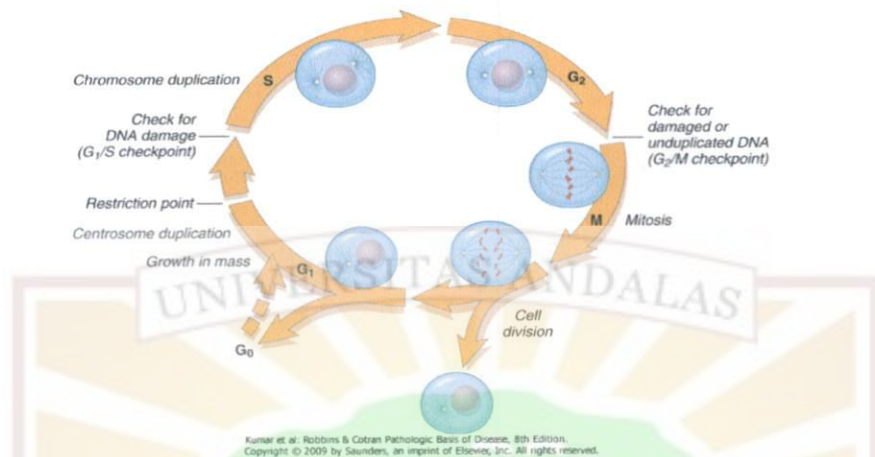
Pusat dari proses proliferasi adalah kontrol dari proses tersebut dalam pengaturan sel di siklus sel. Siklus sel melibatkan sejumlah peristiwa dengan hasil duplikasi DNA dan pembelahan sel. Pada sel normal proses ini terkontrol dengan baik, tetapi pada sel tumor, mutasi dari gen berhubungan dengan siklus sel dalam hubungannya dengan kerusakan DNA melalui siklus sel.

Siklus sel terdiri dari empat fase: (Kumar, 2010)

1. Fase G1 (presintetik)
2. Fase S (sintesis DNA)

3. Fase G₂ (premitosis)

4. Fase M (mitosis)



Gambar 2.1 Siklus Sel (dikutip dari Kumar, 2010)

Lama dari siklus sel bervariasi dari satu spesies dan jaringan dengan yang lainnya, tetapi berkisar antara 16-24 jam. Pada fase G₁, sel mempersiapkan sintesis DNA dan biosintesis dari RNA dan protein. Lama dari fase ini bervariasi. Pada fase S, DNA bereplikasi dan terjadi sintesis histon. Pada akhir fase S, DNA yang berisi sel-sel dalam jumlah dua kali lipat dan terjadi replikasi kromosom. Pada Fase G₂, sel mempersiapkan untuk proses pembelahan dan replikasi DNA kompleks dengan protein dan biosintesisnya dilanjutkan. Pada akhirnya inti dan sitoplasma membelah selama mitosis dan menghasilkan dua *daughter cells*, dan selanjutnya dimulai fase interfase pada siklus sel baru jika keadaan memungkinkan untuk pertumbuhan selanjutnya. Pada saat hilangnya mitogen atau ketika hilangnya nutrisi maka sel dapat juga masuk kedalam fase istirahat pada G₀. Proses transisi dari satu fase ke fase yang lainnya diatur oleh sejumlah “*checkpoint*” yang mencegah proses prematur yang akan masuk kedalam fase

selanjutnya pada siklus sel. *Checkpoint* berfungsi untuk memastikan bahwa sel dengan DNA yang rusak atau kromosom yang rusak tidak bisa melanjutkan replikasinya. *Checkpoint* G1/S memonitor integritas DNA sebelum proses replikasi, sedangkan *checkpoint* G2/M akan memonitor DNA setelah replikasi sekaligus memonitor apakah sel dapat dengan aman masuk kedalam mitosis. Ketika dirasakan terdapat kerusakan DNA maka aktivasi *checkpoint* akan menunda siklus sel dan memicu mekanisme *DNA repair*. Jika kerusakan DNA terlalu berat untuk diperbaiki maka sel akan dieliminasi melalui jalur apoptosis atau melalui keadaan *nonreplicative* yang disebut *senescence*. Kerusakan pada *checkpoint* sehingga memungkinkan DNA yang rusak atau kromosom yang abnormal ikut membelah, akan memproduksi mutasi pada *daughter cells* sehingga dapat menimbulkan keganasan.

Masuk dan berkembangnya sel melalui siklus sel dikendalikan melalui perubahan pada kadar dan aktivitas suatu kelompok protein yang disebut siklin. Pada tahapan tertentu siklus sel, kadar berbagai siklin meningkat setelah didegradasi dengan cepat saat sel bergerak melalui siklus tersebut. Siklin menjalankan fungsi regulasinya melalui pembentukan kompleks dengan protein yang disintesis secara konstitutif yang disebut *Cyclin Dependent Kinase* (CDK). Kombinasi yang berbeda dari siklin dan CDK berkaitan dengan setiap transisi penting dalam siklus sel dan kombinasi ini menggunakan efeknya dengan memfosforilasi sekelompok substrat protein terpilih (protein fosforilat kinase, protein kontraregulasi yang disebut protein defosforilasi fosfatase). Selain dari sintesis dan pemecahan siklin, kompleks siklin CDK juga diatur melalui

pengikatan inhibitor CDK. Kompleks ini sangat penting dalam mengatur tahapan siklus sel ($G1 \rightarrow S$ dan $G2 \rightarrow M$) yaitu tahapan saat sel memeriksa bahwa DNA nya telah direplikasi dengan cukup atau semua kesalahan telah dipulihkan sebelum bergerak lebih lanjut. Kegagalan pemantauan secara memadai terhadap keakuratan replikasi DNA akan menyebabkan akumulasi mutasi dan transformasi ganas. (Kumar, 2010; Macdonald et al, 2004)

2.3 Kanker:

Kanker dianggap suatu kelompok penyakit seluler dan genetik karena dimulai dari satu sel yang telah mengalami mutasi DNA sebagai komponen dasar gen. Sel-sel yang mengalami kerusakan genetik tidak peka lagi terhadap mekanisme regulasi siklus sel normal sehingga akan terus melakukan proliferasi tanpa kontrol (Silalahi, 2006). Kerusakan dalam struktur DNA dapat berakibat pertumbuhan sel yang tidak terkendali yang dikenal dengan penyakit kanker.

Pertumbuhan sel yang normal dikontrol secara baik oleh keseimbangan peningkatan dan penghambatan sinyal pertumbuhan seperti proliferasi yang terjadi hanya pada saat dibutuhkan. Keseimbangan ini akan berubah jika terjadi peningkatan jumlah sel seperti pada proses penyembuhan luka atau pada pergantian jaringan yang normal. Diferensiasi sel selama proses ini terjadi melalui suatu perintah dan proliferasi akan berhenti bila sudah tidak dibutuhkan lagi. Pada sel tumor proses ini mengalami gangguan, dimana terjadi proliferasi sel terus menerus dan hilangnya diferensiasi juga dapat terjadi. Sebagai tambahan proses normal dari kematian sel yang terprogram sudah tidak lagi berjalan.

Kanker timbul dari sel tunggal yang mengalami mutasi. Mutasi gen akan meningkatkan pertumbuhan dibandingkan dengan yang lainnya dan membuat mereka lolos dari kontrol normal pada proliferasi. Mutasi awal akan menyebabkan sel membelah untuk membentuk klon homogen genetik. Selanjutnya mutasi tambahan terjadi dengan penambahan pertumbuhan sel. Mutasi tersebut membuat suatu sub klon didalam masing-masing tumor dengan sifat yang berbeda sehingga beberapa tumor bersifat heterogen.

Tumor dibagi menjadi dua kelompok besar yaitu jinak dan ganas. Tumor jinak jarang mengancam jiwa, dimana pertumbuhannya ada didalam suatu kapsul yang akan membatasi ukuran dan mempertahankan sifat asal sel. Tumor yang ganas yang tidak berkapsul sering menginvasi disekitar jaringan dan menyebar kedaerah yang berbeda dari tubuh untuk menghasilkan pertumbuhan lebih lanjut atau bermetastasis.(Macdonald et al, 2004)

Sel tumor menunjukkan beberapa ciri yang membedakan mereka dari sel yang normal, yaitu:

1. Mereka tidak lagi bergantung pada faktor pertumbuhan sebagai sel normal karena mereka dapat membuat faktor pertumbuhan sendiri untuk menstimulasi proliferasinya. Hal ini disebut dengan proses stimulasi autokrin .
2. Sel normal membutuhkan hubungan dengan permukaan dari lingkungan ekstraseluler agar dapat tumbuh, sedangkan sel tumor bersifat independen.
3. Sel normal mempunyai respon dengan adanya sel lain, dimana pada kultur akan membentuk suatu lapisan tunggal, sedangkan pada sel tumor tidak terdapat ini dan seringkali tumbuh diatas atau dibawah satu sama lain

4. Sel tumor kurang bersifat adesif dibandingkan sel normal
5. Sel normal berhenti berproliferasi ketika mereka telah mencapai densitas tertentu sedang sel tumor akan terus berproliferasi (Sudarto Pringgoutomo et al, 2002)

Karsinogenesis adalah proses pembentukan neoplasma atau sel tumor. Sel yang oleh suatu penyebab berubah menjadi sel neoplastik, membentuk kumpulan sel yang mempunyai sifat tumbuh otonom disebut sel yang mengalami transformasi. Segala sesuatu yang menyebabkan terjadinya kanker disebut karsinogen. Patogenesis molekular neoplasma menunjukkan bahwa neoplasma merupakan penyakit genetik. Perubahan genetik atau kerusakan genetik nonletal disebabkan oleh pengaruh penyebab yang berada pada lingkungan seperti bahan kimia, virus, radiasi atau karena faktor keturunan pada sel germinal. Perubahan materi genetik atau kerusakan gen nonletal demikian, mengakibatkan pembelahan sel berlebihan tidak terkendali.

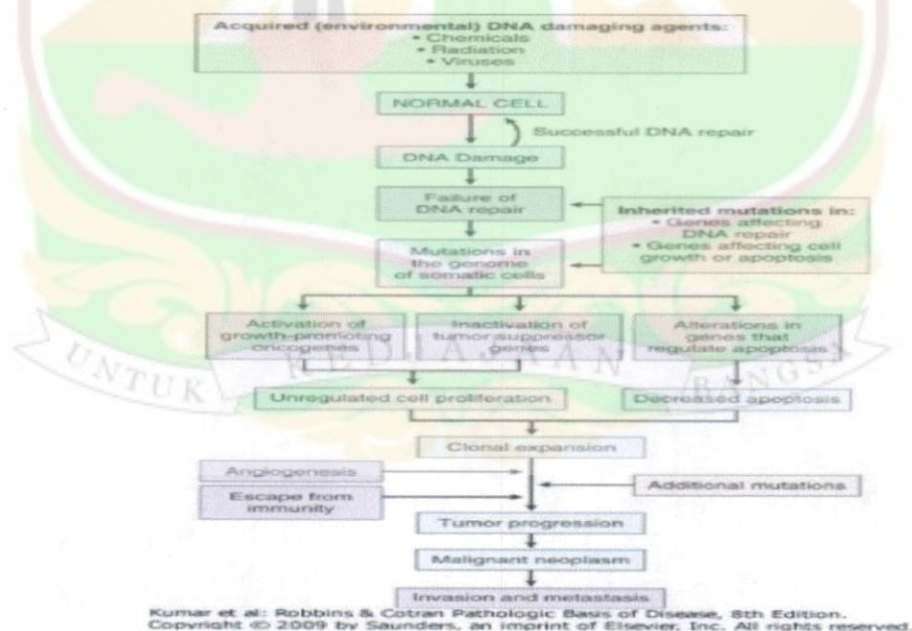
Terdapat 3 golongan gen pengatur pertumbuhan normal yaitu:

1. Proto onkogen, yaitu gen pencetus pertumbuhan
2. Gen penghambat pertumbuhan atau gen supresor tumor
3. Gen yang mengatur kematian sel terprogram atau apoptosis

Disamping ketiga gen diatas terdapat golongan gen yang keempat yang berfungsi memperbaiki kerusakan DNA, yang juga berperan pada karsinogenesis, yaitu gen perbaikan DNA. Gen perbaikan DNA mempengaruhi pembelahan sel atau secara tidak langsung kehidupan sel dengan mempengaruhi kemampuan organisme untuk memperbaiki kerusakan nonletal pada beberapa gen termasuk

proto onkogen, tumor supresor gen dan gen pengatur apoptosis. Ketidak mampuan gen perbaikan DNA dalam menjalankan fungsi normalnya dapat berakibat perluasan mutasi pada gen lain dan meningkatkan transformasi neoplastik.(Sudarto Pringgoutomo et al, 2002)

Karsinogenesis merupakan suatu proses banyak tahap baik pada tingkat fenotipe maupun genotipe. Suatu neoplasma ganas memiliki beberapa sifat fenotipik misalnya pertumbuhan berlebihan, sifat invasif lokal dan kemampuan metastasis jauh. Sifat ini diperoleh secara bertahap, suatu fenomena yang disebut *tumor progression*. Pada tingkat molekular, progresi ini terjadi akibat akumulasi kelainan genetik yang pada sebagian kasus dipermudah oleh adanya gangguan pada perbaikan DNA. Perubahan genetik yang mempermudah *tumor progression* melibatkan tidak saja gen pengendali pertumbuhan, tetapi juga gen yang mengendalikan angiogenesis, invasi dan metastasis. (Kumar, 2010)



Gambar 2.2 Skema dasar molekular kanker (dikutip dari Kumar , 2010)

Pada kanker terdapat 7 perubahan mendasar pada fisiologi sel yang bersama-sama menentukan fenotipe kanker. Ketujuh kunci perubahan itu adalah: (Kumar , 2010)

1. Menghasilkan sinyal pertumbuhan sendiri (*self sufficiency signal*)
2. Insensitivitas terhadap sinyal supresor pertumbuhan
3. Menghindari apoptosis
4. Potensial replikasi yang tidak terbatas
5. Angiogenesis
6. Kemampuan untuk invasi dan metastasis
7. Kerusakan pada perbaikan DNA

2.4. Kanker Payudara

2.4.1 Struktur dan Fungsi Payudara

Sebelum masa pubertas, payudara terdiri atas beberapa duktus yang berhubungan dengan papilla mamma dan permukaan luar, tanpa didapatkan adanya struktur kelenjar. Beberapa saat menjelang menarche, duktus menjadi semakin panjang dan bercabang-cabang serta timbul kuncup terminalis. Dengan terjadinya menstruasi, payudara akan makin berkembang dan berlanjut sampai umur 25 tahun. Perkembangan payudara dipengaruhi oleh koordinasi berbagai hormon. Peranan setiap hormon secara pasti sulit ditentukan karena keduanya mempunyai efek pertumbuhan dan sekresi. Fungsi utama mamma adalah memproduksi dan mensekresi air susu. (Underwood, 2000)

Lobulus merupakan unit sekresi payudara. Tiap lobulus terdiri atas sejumlah asinus, atau kelenjar, yang berada didalam jaringan ikat longgar dan berhubungan

dengan duktus intralobularis. Tiap asinus tersusun atas dua tipe sel, yaitu epitel dan mioepitel. Sel epitel merupakan sel sekresi. Meskipun sintesis air susu ibu hanya berlangsung selama masa akhir kehamilan dan post partum, sel tersebut mensekresi secara terus menerus berbagai jenis glikoprotein yang dimasukkan kedalam lumen kelenjar. Sel epitel dikelilingi oleh sel mioepitel yang mengandung protein kontraktil yang mempunyai fungsi mekanik. Duktus intralobularis berhubungan dengan duktus ekstralobularis dan bersama dengan lobulus disebut unit duktus lobular terminalis.

Duktus ekstralobularis dalam satu daerah yang sama saling berhubungan membentuk duktus subsegmental yang saling berhubungan untuk membentuk duktus segmental. Ini akan bermuara ke duktus laktiferus dan sinus laktiferus, berhubungan dengan permukaan papila mamma melalui orifisium yang terpisah. Terdapat sekitar 15-20 duktus laktiferus yang masing-masing mengalirkan satu segmen mammae. Duktus dilapisi oleh sel epitel yang dikelilingi oleh sel mioepitel. Stroma jaringan ikatnya lebih padat dibandingkan dengan lobulusnya, dan duktus dikelilingi oleh jaringan elastik yang membantu fungsi drainase. (Underwood, 2000)

2.4.2 Insiden dan Epidemiologi

Kanker payudara invasif adalah kanker yang paling sering menyerang wanita, dan diperkirakan sekitar 22% dari seluruh kanker pada wanita serta sekitar 26% terdapat pada negara maju. Risiko kanker payudara lebih rendah terjadi pada negara yang berkembang seperti pada Afrika, Asia selatan dan timur. Prognosis penyakit ini sangat baik jika dapat dideteksi pada stadium awal. Faktor risiko

penyakit ini meningkat hingga awal tahun 1980 an di negara berkembang dan sedang berkembang. Setelah itu dengan adanya alat mammografi menyebabkan perubahan kelangsungan hidup baik pada insiden dan angka kematian.

Insiden kanker payudara, seperti pada tumor epitelial meningkat cepat sesuai dengan umur penderita, dimana terjadi kurva yang meningkat sangat tajam hingga usia menopause dan kemudian terjadi penurunan sesudah itu. Sekitar tahun 1990-an insiden kanker payudara bervariasi 10 kali lipat pada seluruh dunia. Hal ini menunjukkan perbedaan yang penting pada distribusi dari penyebab yang mendasari. (Tavasolli, 2003)

2.4.3 Etiologi

Etiologi dari kanker payudara meliputi dari banyak faktor termasuk diantaranya diet, faktor reproduksi dan gangguan hormonal. Secara nyata kanker payudara merupakan penyakit yang menyerang pada negara maju yang berhubungan dengan gaya hidup orang Barat, yang memiliki ciri seperti diet tinggi kalori, diet tinggi protein hewani beserta protein dan dikombinasi dengan kurangnya olahraga.

Masalah reproduksi juga menjadi salah satu faktor risiko pada kanker payudara wanita. Kanker payudara sering terjadi pada wanita dengan menarche usia muda, nulipara, wanita dengan sedikit anak, melahirkan pada usia tua, serta pada menopause yang terlambat.

Faktor hormonal yang sering berhubungan dengan kanker payudara wanita adalah kontrasepsi oral dan terapi hormon pengganti menopause. Masalah nutrisi

seperti buah-buahan dan sayur kemungkinan juga dihubungkan dengan berkurangnya risiko terhadap kanker payudara. (Sudarto P, 2006)

2.4.4 Faktor Risiko Kanker Payudara

Beberapa faktor risiko yang dapat menyebabkan kanker payudara antara lain : (Kumar, 2010)

- a) Usia: kanker payudara jarang terjadi pada perempuan dengan usia dibawah 30 tahun.
- b) Genetika dan riwayat keluarga: sekitar 5-10% kanker payudara berkaitan dengan mutasi herediter spesifik. Perempuan lebih besar kemungkinannya membawa gen kerentanan kanker payudara jika mereka mengidap kanker payudara sebelum menopause, mengidap kanker payudara bilateral, mengidap kanker terkait lain (seperti kanker ovarium), memiliki riwayat keluarga yang signifikan (yaitu banyak anggota keluarga yang terjangkit sebelum menopause) atau berasal dari kelompok etnik tertentu. Sekitar separuh perempuan dengan kanker payudara herediter memperlihatkan mutasi di gen BRCA1 (pada kromosom 17q21.3) dan sepertiga lainnya mengalami mutasi di BRCA2 (di kromosom 13q12-13). Gen ini berukuran besar dan kompleks serta tidak memperlihatkan homologi yang erat diantara keduanya, juga dengan gen lain yang diketahui.
- c) Paparan lama estrogen eksogen pascamenopause yang dikenal sebagai terapi sulih hormon, diakui dapat mencegah atau paling tidak menunda onset osteoporosis dan melindungi pemakai dari penyakit jantung dan stroke.

- d) Kontrasepsi oral juga dicurigai meningkatkan risiko kanker payudara. Walaupun buktinya juga saling bertentangan, formulasi yang baru berupa dosis rendah seimbang estrogen dan progestin hanya sedikit meningkatkan resiko dan 10 tahun setelah penghentian pemakaiannya risiko akan menurun.
- e) Radiasi pengion kedada meningkatkan risiko kanker payudara. Besar risiko tergantung pada dosis radiasi, waktu sejak pajanan dan usia.

2.4.5 Patogenesis Kanker Payudara

Seperti kanker lainnya, penyebab kanker payudara masih belum diketahui. Namun tiga faktor yang penting adalah : perubahan genetik, pengaruh hormon dan faktor lingkungan:

1. Perubahan genetik selain menyebabkan sindroma familial, diduga juga berperan dalam timbulnya kanker payudara sporadik. Seperti pada sebagian besar kanker lainnya, mutasi yang mempengaruhi protoonkogen dan gen supresor tumor di epitel payudara ikut serta dalam proses transformasi onkogenik. Diantara berbagai mutasi tersebut, yang paling banyak dipelajari adalah ekspresi berlebihan protoonkogen ERBB2 (HER2/NEU) yang diketahui mengalami amplifikasi pada hampir 30% kanker payudara. Gen ini adalah anggota dari famili reseptor faktor pertumbuhan epidermis dan ekspresi berlebihannya berkaitan dengan prognosis yang buruk. Saat ini telah diketahui terdapat tiga gen yaitu p53, BRCA1 dan BRCA2 yang ketika diwariskan dalam bentuk yang diubah akan memberikan risiko yang relatif tinggi. Mutasi yang diwariskan dari p53 bertanggung jawab untuk beberapa kasus seperti sindrom Li Fraumeni. Gen BRCA1 yang pada awalnya terdapat

di kromosom 17q21 pada riwayat keluarga kanker ovarium-payudara dan pada kanker payudara awal. Pada penelitian genetika menunjukkan hampir pada semua kasus riwayat keluarga dengan kanker ovarium-payudara terjadi mutasi BRCA1. Gen BRCA2 terdapat di kromosom 13q dan diperkirakan mencapai sekitar 40% pada keluarga yang memiliki kecenderungan kanker payudara.

2. Pengaruh hormonal: kelebihan estrogen endogen atau yang lebih tepat ketidakseimbangan hormon jelas berperan penting. Banyak faktor risiko yang telah disebutkan yaitu: usia subur yang lama, nuliparitas dan usia lanjut saat memiliki anak pertama mengisyaratkan peningkatan pajanan ke kadar estrogen yang tinggi saat daur haid. Estrogen merangsang pembentukan faktor pertumbuhan oleh sel epitel payudara normal dan oleh sel kanker. Dihipotesiskan bahwa reseptor estrogen dan progesteron yang secara normal terdapat di epitel payudara, mungkin berinteraksi dengan promotor pertumbuhan, seperti *transforming growth factor α* , *platelete derived growth factor* dan faktor pertumbuhan fibroblas yang dikeluarkan oleh sel kanker payudara untuk menciptakan suatu mekanisme autokrin perkembangan tumor.
3. Faktor lingkungan diisyaratkan oleh insidensi kanker payudara yang berbeda-beda dalam kelompok yang secara genetis homogen dan perbedaan geografik dalam prevalensi. (Dickson, 1988; Constatinides, 1994)

2.4.6 Klasifikasi

Berdasarkan pembagian jenis histologik kanker payudara menurut *World Health Organization* (WHO) tahun 2003 adalah : (Tavasolli FA, 2003)

Epithelial tumours

Invasive ductal carcinoma, not otherwise specified

Mixed type carcinoma

Pleomorphic carcinoma

Carcinoma with osteoclastic giant cells

Carcinoma with melanotic features

Invasive lobular carcinoma

Tubular carcinoma

Invasive cribriform carcinoma

Medullary carcinoma

Mucinous carcinoma and other tumours with abundant mucin

Mucinous carcinoma

Cystadenocarcinoma and columnar cell mucinous carcinoma

Signet ring cell carcinoma

Neuroendocrine tumours

Solid neuroendocrine carcinoma

Atypical carcinoid tumour

Small cell/oat cell carcinoma

Large cell neuroendocrine carcinoma

Invasive papillary carcinoma

Invasive micropapillary carcinoma

Apocrine carcinoma

Metaplastic carcinoma

Pure epithelial metaplastic carcinomas

Squamous cell carcinoma

Adenocarcinoma with spindle cell metaplasia

Adenosquamous carcinoma

Mucoepidermoid carcinoma

Mixed epithelial/mesenchymal metaplastic carcinomas

2.5 Lengkuas (*Alpinia Galanga* (L) Wild):

Klasifikasi menurut Kusumawardani, 2009 (Kompasiana, 2011)

Kingdom : Plantae
 Division : Spermatophyta
 Sub Divisi : Angiospermae
 Kelas : Monocotyledone
 Bangsa : Zingiberales
 Suku : Zingiberaceae
 Marga : *Alpinia*
 Species : *Alpinia Galanga* (L.) Wild
 Sinonim : *Alpinia galanga* Stuntz

Lengkuas merupakan tanaman yang berumut panjang, tinggi sekitar 1 sampai 2 meter, bahkan dapat mencapai 3,5 meter. Biasanya tumbuhan ini tumbuh dalam rumpun yang rapat, batangnya tegak, tersusun pelepah-pelepah

daun yang bersatu membentuk batang semu. Berwarna hijau agak keputih-putihan. Daunnya tunggal berwarna hijau, bertangkai pendek, tersusun berseling. Bentuk daun lanset memanjang, ujung runcing, pangkal tumpul, dengan tepi daun rata. Panjang daun sekitar 20-60 cm dan lebarnya sekitar 4- 415 cm. Buah lengkuas berbentuk bulat, keras. Sewaktu muda berwarna hijau-kuning, setelah tua berubah menjadi hitam kecoklatan, mempunyai diameter lebih kurang 1 cm. Ada juga yang buahnya berwarna merah, bijinya kecil-kecil berbentuk lonjong, berwarna hitam. Batangnya yang disebut sebagai rimpang berbentuk besar, tebal, berdaging, berbentuk silindris, diameter sekitar 2-4 cm dan bercabang-cabang. Bagian luar berwarna coklat agak kemerahan atau kuning kehijauan pucat, mempunyai sisik-sisik berwarna putih atau kemerahan, keras mengkilap sedangkan bagian dalamnya berwarna putih. Daging rimpang yang sudah tua berserat kasar. Apabila dikeringkan, rimpang berubah menjadi agak kehijauan dan seratnya menjadi keras dan liat. (Erna sinaga, 2000)

Sebenarnya lengkuas ada dua macam yaitu lengkuas merah dan putih. Lengkuas putih banyak digunakan sebagai rempah atau bumbu dapur, sedangkan yang banyak digunakan sebagai obat adalah lengkuas merah. Pohon lengkuas putih umumnya lebih tinggi daripada lengkuas merah. Pohon lengkuas putih dapat mencapai tinggi 3 meter, sedangkan pohon lengkuas merah umumnya hanya sampai 1-1,5 meter.



Gambar 2.3 Pohon dan Rimpang Lengkuas (Erna Sinaga, 2000)

Lengkuas tumbuh ditempat terbuka yang mendapat sinar matahari penuh atau yang sedikit terlindung. Lengkuas menyukai tanah yang lembab dan gembur, tetapi tidak suka tanah yang becek. Tumbuh subur didaerah dataran rendah sampai ketinggian 1200 meter diatas permukaan laut. Di Indonesia banyak ditemukan tumbuh liar di hutan jati atau didalam semak belukar. Tumbuhan ini berasal dari Asia tropika, tetapi tidak begitu jelas dari daerah mana. Ada yang menduga berasal dari Cina, ada juga yang berpendapat berasal dari Bengali. Tetapi sekarang lengkuas sudah tersebar diberbagai daerah di Asia tropis seperti: Indonesia, Malaysia, Filipina, Cina bagian selatan, Hongkong, India, Bangladesh, Suriname.

Bagian lengkuas yang sering digunakan adalah rimpangnya dan sering dipergunakan untuk mengatasi gangguan lambung, menambah nafsu makan, menetralkan keracunan, menghilangkan rasa sakit, melancarkan buang air kecil, obat diare, demam, sakit tenggorokan, batuk berdahak. Beberapa khasiat dari lengkuas yang pernah dibuktikan secara ilmiah melalui beberapa penelitian adalah

sebagai anti jamur, penyakit kulit, jerawat, bisul dan sebagainya. Disamping itu rimpang lengkuas juga dianggap memiliki khasiat sebagai anti tumor atau anti kanker. (Erna Sinaga,2000)

Kepentingan klinis dari lengkuas terletak pada kandungan substansi kimia yang memproduksi suatu reaksi fisiologis pada tubuh manusia. Komponen bioaktif yang penting pada lengkuas antara lain: (Kiranmayee Rao, 2011)

1. Terpenoid: merupakan zat aktif yang dapat melawan bakteri, jamur, virus dan protozoa. Contoh dari terpenoid adalah: kamfer, methanol, farnesol, artemisinin.
2. Fenol: berasal dari phenylpropanoid, phenylpropanoidasetat, dan mempunyai fungsi melawan herbivora dan zat patogen serta mempunyai fungsi mekanik dalam membantu penyerbukan dan penyerapan sinar ultra violet
3. Flavonoid: berasal dari phenylpropanoid. Mayoritas dari flavonoid adalah glikosida. Kelompok ini termasuk anthosianin, flavon, flavonol dan

(senyawa aktif dan tidak aktif) dari berbagai golongan yang terlarut dalam pelarut yang sesuai. (Hernani et al, 2007)

Pada penelitian yang dilakukan oleh Rusmarilin (2003) menyebutkan bahwa lengkuas memiliki kandungan *I' acetoxychavicol acetate (ACA)* yang mempunyai potensi untuk menurunkan kejadian kanker yang disebabkan oleh induksi senyawa karsinogen. Penelitian ini digunakan untuk melihat sejauh mana lengkuas dapat berperan sebagai anti kanker dan dapat digunakan sebagai *tumor chemoprevention* serta untuk membuktikan bahwa ekstrak rimpang lengkuas lokal mempunyai kemampuan menghambat berbagai jenis alur sel kanker manusia secara *in vitro* maupun pada mencit percobaan. Untuk mendapatkan kadar *ACA* yang tinggi diperlukan pelarut lain yang bersifat tidak beracun. Sebagai bahan ekstraksi adalah bubuk lengkuas kering. Bubuk lengkuas dibuat dari rimpang lengkuas segar, digiling dengan penggilingan listrik dan disaring dengan ayakan 60 mesh, selanjutnya dikeringkan dengan alat pengering beku. Bubuk lengkuas diekstrak menggunakan pelarut khloroform, etil asetat, alkohol atau akuades. Supernatan yang dihasilkan dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator*, ditambahkan petroleum eter dan disimpan dalam lemari pendingin suhu -30°C , endapan yang terbentuk direkristalisasi dan dipekatkan dengan gas nitrogen, sehingga diperoleh ekstrak lengkuas. Ekstraksi lengkuas merah umur panen 9 bulan dan maserasi selama 48 jam menggunakan pelarut etil asetat ternyata memberikan hasil yang lebih tinggi daripada khloroform, alkohol atau air yaitu sebesar $1,62 \pm 0,02\%$ berat kering. Kandungan *ACA* yang tinggi diduga

memberikan respon aktivitas antioksidan yang lebih kuat. Oleh karena kandungan *ACA* pada ekstrak lengkuas putih rendah, maka tidak diteliti lebih lanjut. Ekstrak etil asetat lengkuas merah digunakan untuk penelitian selanjutnya. Ekstrak etil asetat lengkuas ternyata dapat menghambat proliferasi sel kanker dalam kultur baik menggunakan alur sel kanker maupun sel kanker primer manusia. Penghambatan proliferasi sel kanker diukur berdasarkan jumlah sel yang hidup dalam kultur dengan hemositometer. Mekanisme penghambatan yang terjadi diduga karena apoptosis yaitu kematian sel yang terprogram. Hasil uji toksisitas secara *in vitro* berdasarkan pengukuan LD_{50} terhadap mencit jantan dan betina strain C3H yaitu sebesar 765mg/kgberat badan. Konsentrasi 765 mg/kg berat badan merupakan batas konsentrasi tertinggi yang dapat membunuh 50% mencit percobaan. Diatas dosis 765mg/kg berat badan akan menyebabkan kematian mencit karena kemungkinan terjadi keracunan akibat ekstrak lengkuas. Hasil penelitian jaringan kanker pada mencit yang ditransplantasi dengan sel kanker primer menunjukkan bahwa dosis ekstrak lengkuas 750mg/kg berat badan pada mencit dengan karsinoma tubular padat kanker payudara serta pada mencit rhabdomiosarkoma memberikan gambaran makroskopik yang lebih baik dibanding dengan dosis yang lebih kecil. Demikian pula dengan volume dan berat jaringan kanker. Pertumbuhan jaringan kanker yang relatif kecil menunjukkan bahwa ekstrak lengkuas dapat menghambat proliferasi sel kanker. (Rusmarilin,2003)

Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Hartono (2009) dengan menggunakan ekstrak etil asetat lengkuas dosis bertingkat 225mg/kgBB/hari, 450

mg/kg BB/hari dan 750mg/kg BB/hari , didapatkan hasil penurunan aktifitas proliferasi dan peningkatan skor apoptosis pada mencit C3H adenokarsinoma mamma, akan tetapi pada penelitian tersebut ternyata banyak didapatkan mencit yang mati. Dari 28 ekor sampel mencit C3H yang dipakai penelitian ternyata 12 ekor mati sebelum selesai penelitian. Penelitian tetap diteruskan sampai akhir jadwal penelitian, dengan mengevaluasi penyebab kematian mencit. Untuk mengetahui efek samping dari ekstrak etil asetat *Alpinia galanga* dilakukan evaluasi organ hepar, ginjal dan gaster. Dari pemeriksaan organ didapatkan kesimpulan bahwa dosis lengkuas bertingkat yang diberikan pada mencit mempunyai dosis toksik di ginjal yaitu terjadi udem interstitial pada tubulus proksimal ginjal, sedangkan pada organ hepar dan lambung tidak berpengaruh. (Hartono, 2009)

Muangnoi *et al* (2007) pada penelitian yang menggunakan ekstrak air alpinia galanga di Malaysia dan Thailand dilaporkan IC_{50} setelah terpapar 48 jam sel kanker payudara MCF 7 dengan ekstrak air lengkuas adalah $>25\mu\text{g/ml}$, sementara ekstrak methanol memiliki IC_{50} $5,4\mu\text{g/ml}$. Efek apoptosis juga didapatkan pada penelitian menggunakan ekstrak kasar. Komponen pada ekstrak alpinia galanga yang diserap adalah *ACA*, dimana *ACA* telah menunjukkan menginduksi apoptosis pada sel mieloma melalui penghambatan NF κ B dan juga menunjukkan sitotoksik dari berbagai jalur tumor solid termasuk jalur sel kanker paru jenis sel bukan kecil dan jalur sel kanker payudara MCF 7.

2.6 Mencit strain C3H

2.6.1 Perkembangan dan Regresi Kelenjar Mamaria Mencit

Kelenjar mamaria tikus ada sepuluh buah, dimana terdapat 5 buah puting susu pada setiap sisi *midline* anterior disepanjang garis mamaria. Kelenjar – kelenjar tersebut terdapat dibawah bantalan lemak subkutan. Proses mammogenesis pada mencit dimulai dari tunas, dimana masing-masing tunas berkembang menjadi cabang-cabang dan dari cabang terminal berkembang menjadi alveoli. Ketika perkembangan alveolar berlanjut, lobulus mulai rudimenter pada ujung distal dari cabang. Tunas lateral dan ujung seringkali terlihat pada mammae saat bulan pertama, dan kemudian akan menghilang. Cabang terminal kecil diketahui saat bulan ketiga. Perkembangan awal alveoli payudara terjadi pada akhir bulan ketiga. Biasanya peningkatan jumlah alveoli menunjukkan hubungan langsung dengan umur binatang. (Turusov and Mohr, 1994)

2.6.2 Histologi Kelenjar Mamaria Mencit

Kelenjar mamaria mencit terdiri atas jaringan lemak dengan duktus dan alveolar lobuli yang tersebar. Kelenjar limfonodi yang besar biasanya terdapat pada pertengahan bantalan lemak mamaria. Morfologi yang mendetail pada kelenjar mamaria mencit sangat sederhana dibandingkan payudara manusia. Kelenjar mamaria mencit tertentu memiliki jaringan ikat yang sedikit, dan menunjukkan lobulus sederhana dan jumlah stroma periepitelial yang sedikit, serta tidak mengandung kelenjar apokrin.

2.6.3 Pertumbuhan Tumor Pada Mencit

Pertumbuhan tumor spontan pada mencit memiliki frekuensi yang bervariasi tergantung pada kerentanan genetik dan ada atau tidaknya transmisi melalui susu MMTV (*Mouse mamary tumour virus*). Pada mencit dengan kecenderungan mudah untuk menjadi kanker tinggi memerlukan perkembangan mamaria yang lengkap untuk mendapatkan perubahan yang dapat terdeteksi. Perkembangan karsinogenesis mamaria pada jenis mencit yang cenderung mudah menjadi kanker adalah perubahan pre kanker yang diikuti oleh pertumbuhan malignansi. Progresifitas tumor mungkin dipengaruhi oleh keadaan stabilitas, warisan dan perubahan ireversibel pada satu atau lebih karakter perkembangan tumor. Angka pertumbuhan tumor pada mencit bervariasi jenisnya bahkan dengan jenis yang sama. Perbedaan pertumbuhan tumor mamaria ditemukan signifikan pada sejumlah jenis. Pada tumor mamaria strain C3H memiliki pertumbuhan sekitar 2,4 mm per minggunya dan sangat malignan, sedang pada strain RIII menunjukkan pertumbuhan yang lebih rendah sekitar 1,3 mm per minggunya serta kurang malignan. (Turusov and Mohr, 1994)

2.6.4 Transplantasi

Transplantasi nodul tumor biasanya dilakukan kedalam kelenjar mamaria yang bebas lemak pada mencit. Ketika nodul jaringan mamaria dipindahkan dari donor yang sama kemudian ditransplantasikan maka tumor mamaria akan muncul dengan waktu yang singkat. Transplantasi yang normal dapat mengalami transformasi nodular setelah beberapa saat dan tumor yang timbul akan berkembang setelah transformasi tersebut. Karakteristik yang ditunjukkan oleh

masing-masing nodul sangat stabil dalam garis transplan dan tidak terpengaruh satu sama lainnya. (Turusov and Mohr, 1994)

2.6.5 Morfologi dan Biologi Tumor Mamaria Mencit

a. Makroskopis

Kelenjar mamaria mencit betina mempunyai jaringan yang luas sehingga tumor mamaria dapat berkembang pada bagian subkutan dari tubuh. Mencit pembawa MMTV menunjukkan distribusi tumor mamaria yang baik diantara kelenjar mamaria anterior (torak-servikal) dan posterior (abdomen-inguinal). Pada pemeriksaan makroskopis, tumor kelenjar mamaria mencit terlihat bulat, oval atau berbentuk nodular, masa berbatas tegas yang dapat dengan mudah dipisahkan dan menunjukkan dilatasi pembuluh darah disekitar mereka. Bentuk permukaan bervariasi mulai dari hijau keputihan hingga hitam kemerahan tergantung pada tumor dan jenisnya, sentral nekrosis seringkali berhubungan dengan ukuran tumor. (Turusov and Mohr, 1994; Dunn, 1958)

b. Mikroskopis

Kanker mamaria pada mencit seringkali terdapat pada asinus. Perubahan neoplastik mungkin dipengaruhi oleh satu atau lebih asini didekatnya. Pengaruh pada asini biasanya kecil, tidak kistik dan menunjukkan perubahan yang progresif dari sekeliling epitel. Duktuli mamaria biasanya juga merupakan tempat yang sering terjadi transformasi dimana plak sering ditemukan. Sebaliknya sistem duktus mamaria relatif jarang merupakan asal keganasan pada mencit. (Turusov and Mohr, 1994; Dunn, 1958)

2.6.6 Pembagian Histologi Tumor Mamaria Mencit, berdasarkan Klasifikasi

Dunn:

1. Karsinoma :

Adenokarsinoma tipe A

Adenokarsinoma tipe B

Adenokarsinoma tipe C

Adenokarsinoma tipe Y, tubular, bercabang

Adenokarsinoma tipe L, sekresi dengan tunas

Tipe *Undifferentiated*

Karsinoma tipe P, respon kehamilan

Karsinoma dengan diferensiasi sel skuamosa

Adenoakanthoma (adenoskuamosa karsinoma)

Neoplasma tipe jaringan ikat:

2. Karsinosarkoma

Kelenjar dan jaringan fibrosa

Kelenjar, jaringan fibrosa, osteoid dan mioepithelium

Fibrosarkoma

Hemangioendotelioma

2.6.7 Mencit jenis pembawa MMTV

Tumor mamaria yang terjadi secara spontan pada jenis mencit yang rentan pembawa susu yang menularkan MMTV biasanya berjenis adenokarsinoma tipe A atau B. Dari 257 jenis tumor mamaria yang diobservasi sebagai pembawa MMTV, strain C3H, BALB/cfC3H dan DBA betina, 254 (99%) berjenis

adenokarsinoma tipe A atau B. Adenokarsinoma tipe A lebih sering terjadi pada strain C3H serta timbul nodul hiperplasi alveolar. (Turusov and Mohr, 1994)

2.6.8 Proses Infeksi MMTV Pada Mencit

Siklus kehidupan MMTV dimulai pada saat penghisapan susu oleh anak mencit ke ibu mencit yang sudah terinfeksi virus . Proses pengosongan vena gastrika menuju ke hilus superior limpa akan berakibat pada anak mencit yang rentan, karena pada proses tersebut terjadi transit virus yang terinfeksi di sel limfoid yang rentan di organ limpa. Setelah beberapa hari virus akan menginfeksi sel B pada jaringan limfoid di pencernaan , misalnya: plak peyeri. Sel limfoid yang terinfeksi memegang peranan penting pada infeksi sel epitel mamaria, dimana terjadi transfer infeksi virus saat kontak dari satu sel ke sel lain atau sel limfoid yang terinfeksi merupakan alat untuk menularkan infeksi virus ke kelenjar mamaria masih belum diketahui secara pasti. (Callahan and Smith, 2000)

2.7 KI- 67

Ki-67 adalah salah satu jenis pemeriksaan imunohistokimia yang digunakan untuk mendeteksi / mengevaluasi faktor pertumbuhan dari jaringan neoplasma/ proliferasi sel. Ki-67 diidentifikasi oleh Gerdes et al pada tahun 1991 sebagai protein nonhiston. Ki-67 merupakan gen yang mempunyai lengan panjang pada kromosom manusia 10 (10q25). Protein besar isoform dari Ki-67 mempunyai masa molekul 359kD, sedang protein yang kecil mempunyai masa 320kD. (Urruticoechea, 2005, Azambuja DE et al, 2007)

Antigen Ki-67 merupakan protein dengan inti besar yang diekspresikan pada seluruh fase aktif siklus sel (G1,S,G2,M). Ekspresi Ki-67 dimulai pada pertengahan fase G1, meningkat pada saat memasuki fase S dan G2, dan mencapai puncak pada fase M pada siklus sel, dan dikatabolisme dengan cepat pada akhir fase M dan tidak terdeteksi pada fase G0 dan awal G1. Pada saat masuk fase G1, antigen Ki-67 ada di regio perinukleolus, pada fase berikutnya antigen juga terdeteksi pada daerah nukleus. Pada saat mitosis, antigen Ki-67 ada pada seluruh kromosom dan nampak sebagai struktur retikuler yang mengelilingi seluruh kromosom metafase. Pewarnaan imunitas Ki-67 secara cepat menurun selama anafase dan telofase. Waktu paruh dari protein Ki-67 diperkirakan sekitar 60-90 menit. (Urruticoechea , 2005)

Penampilan sel dan lokasi dari protein Ki-67 melalui siklus sel tidaklah homogen. Selama awal fase G1, ditemukan pewarnaan yang lemah dengan fokus yang berlainan didalam karyoplasma. Selama fase S dan G2, ditemukan hubungan antara regio inti pada fokus besar seperti pada beberapa regio heterokromatin. Pada saat membran inti terganggu selama awal mitosis, maka Ki-67 menunjukkan ekspresi yang kuat berhubungan dengan permukaan dari kromosom kondensasi pada sitoplasma.

Ekspresi Ki-67 biasanya diperkirakan dengan persentase dari positifitas proliferasi sel tumor yang terwarnai oleh antibodi, dengan kriteria positifitas berupa inti yang terwarnai. Indeks proliferasi dari Ki-67 dinilai dengan menghitung 500-1000 sel dan dilaporkan sebagai persentase positif sel, biasanya

digunakan hasil positif 20% sudah dinyatakan “positif” berdasarkan hasil akhir penelitian di beberapa literatur. Ekspresi Ki-67 sangat berhubungan dengan pertumbuhan (*growth fraction*) dan tidak nampak selama proses perbaikan DNA. Ki67 dihubungkan dengan petanda proliferasi sel, dan pada *invasive breast cancer* digunakan untuk menentukan grading yang berhubungan dengan prognosa pasien. (Puay et al, 2005; Gerdes et al, 1991; Masaru et al, 1995)

Pada beberapa penelitian telah dilaporkan hasil Ki-67 pada jaringan payudara normal. Pada sampel payudara normal atau pada epitel normal disekitar fibroadenoma diekspresikan Ki-67 pada tingkat yang sangat rendah. Sedang pada penelitian lain menunjukkan hilangnya positifitas Ki-67 pada populasi dengan ER positif. (Urruticoechea, 2005)

2.8 Nuclear Factor Kappa B (NFκB)

NFκB merupakan faktor transkripsi proinflamasi yang berperan dalam perkembangan dan progresifitas dari kanker malignan. Target gen NFκB mendukung dari proliferasi sel, kelangsungan hidup (apoptosis), metastasis, inflamasi, invasi dan angiogenesis. (Gautham Sethi et al, 2008; Subash C. Gupta, 2010). Selama ini telah banyak bukti-bukti muncul yang mengindikasikan bahwa pada tingkat molekular, penyakit kronis termasuk kanker disebabkan oleh disregulasi respon inflamasi. Salah satu hubungan penting antara inflamasi dan kanker adalah faktor transkripsi proinflamatori NFκB. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa beberapa tanaman obat yang dapat digunakan sebagai anti kanker memiliki cara dengan menekan jalur sinyal NFκB. (Subash et al, 2010)

NF κ B merupakan anggota dari keluarga protein rel dan terdiri heterodimer yang khusus dari p50, p65 dan sub unit I κ B α . NF κ B biasanya ditemukan di sitosol dan tidak teraktivasi oleh adanya interaksi dengan keluarga penghambat I κ B α . Pada saat teraktivasi maka I κ B α mengalami fosforilasi, ubiquitinasi dan degradasi melalui proteosom 26s, kemudian NF κ B mengalami translokasi menuju ke inti dan berikatan dengan urutan DNA khusus pada promoter target gen yang menstimulasi transkripsi mereka. Produk protein dari gen tersebut termasuk didalamnya sitokin, sel molekul adesi, kemokin yang memperantarai pengaturan dari pertumbuhan sel pada beberapa sel. (Keisuke Ito et al, 2005; Subash C. Gupta, 2010)

Kandungan aktif NF κ B telah ditemukan tidak hanya pada garis sel manusia tetapi juga terdapat pada jaringan tumor pasien seperti pada *multiple myeloma*, *acute myelogenous leukemia*, kanker prostat, kanker payudara. Penekanan NF κ B pada tumor-tumor tersebut telah menunjukkan penghambatan proliferasi yang menyebabkan siklus sel berhenti dan terjadi apoptosis. (Shishir Shisodia, 2004). NF κ B diaktifkan oleh beberapa stimulus yang berbeda termasuk sitokin proinflamatori seperti *tumor necrosis factor α* (TNF α), interleukin 1 β (IL-1 β), *epidermal growth factor* (EGF), mitogen sel T dan B, lipopolisakarida (LPS), radiasi pengion, dan agen kemoterapi. Salah satu gen pertama yang mengaktifkan NF κ B adalah I κ B α sendiri yang mengaktifkan transport NF κ B dari inti ke sitoplasma. Beberapa gen yang memperantarai proliferasi sel diatur oleh NF κ B antara lain:

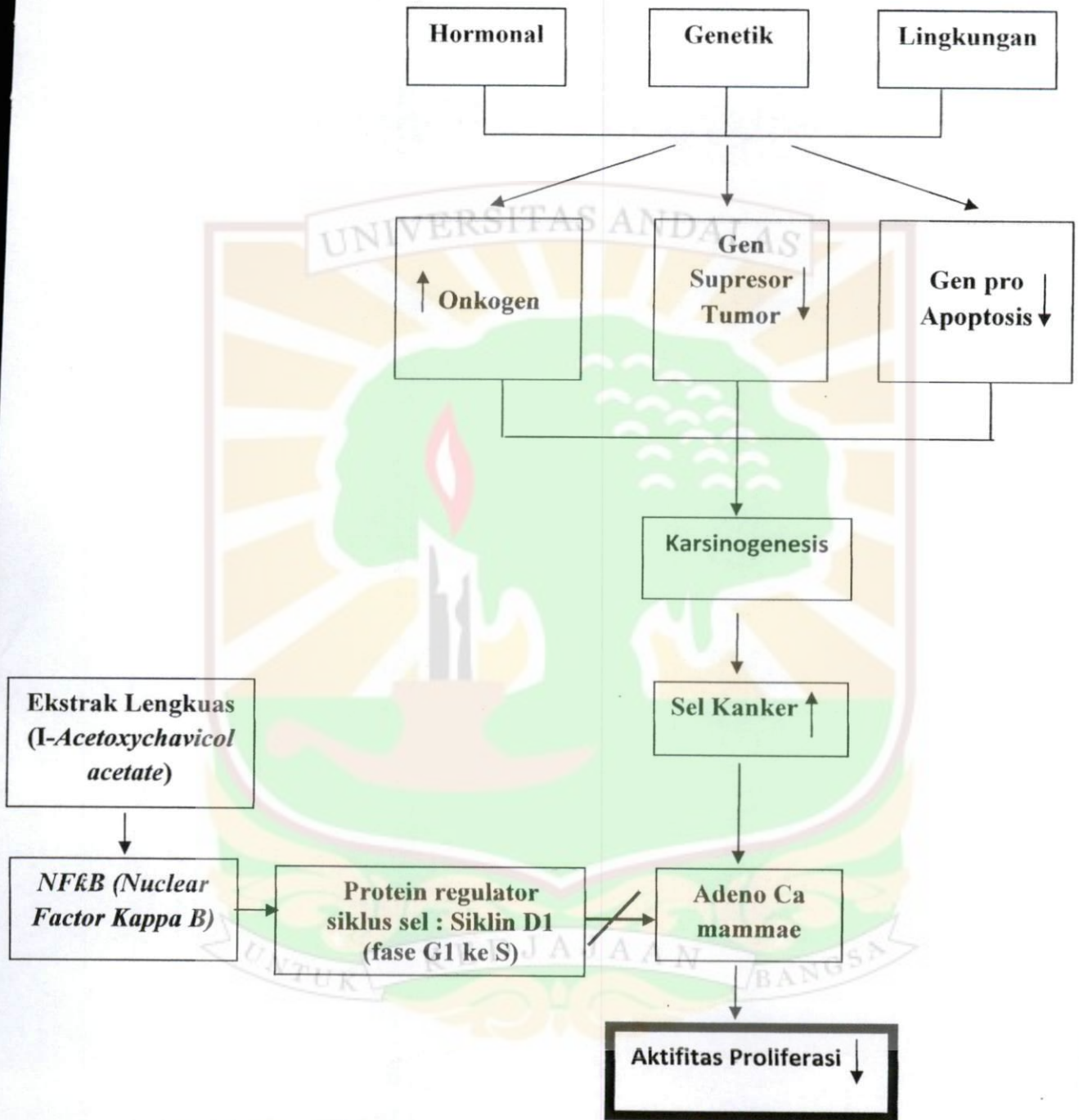
1. Protein regulator siklus sel tertentu, seperti Siklin D1 yang dibutuhkan untuk transisi sel dari fase G1 ke S
2. Faktor pertumbuhan yang dipengaruhi oleh sitokin seperti: TNF α , IL-1 β dan IL-6 serta reseptor faktor pertumbuhan seperti: HER-2
3. PGE2 yang mengontrol Cyclooxygenase 2 (COX-2)
4. EGF melalui fosforilasi tyrosin I κ B α
5. PDGF (*Platelete Derived Growth Factor*)

(Gautam Sethi et al, 2008; Shishir Shishodia 2004; Bharat B. Aggarwal, 2006).

Keisuke Ito et al (2005) telah melaporkan tentang ACA sebagai zat aktif lengkuas yang dapat menghambat pertumbuhan sel *multiple myeloma* melalui penghambatan aktivitas NF κ B. Pada sel myeloma, ACA menginduksi fase Go-G1 ke siklus sel istirahat yang diikuti dengan apoptosis. Disamping itu ACA secara signifikan menghambat fosforilasi serin dan degradasi I κ B α , dan menurunkan ekspresi inti NF κ B sehingga terjadi penghambatan translokasi NF κ B dari sitosol ke inti.(Keisuke Ito et al, 2005)

BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Yang diperiksa

Patogenesis dari kanker payudara masih belum diketahui secara pasti, tetapi terdapat beberapa faktor penting yang mempengaruhi terjadinya kanker payudara yaitu:

1. Faktor genetika
2. Faktor hormonal
3. Faktor lingkungan

Faktor –faktor tersebut diatas yang menyebabkan terjadinya kerusakan pada tingkat DNA sehingga apabila tubuh tidak berhasil memperbaiki DNA maka akan terjadi mutasi pada gen-gen di DNA. Selanjutnya mutasi DNA akan menyebabkan:

1. Pengaktifan onkogen akibat adanya mutasi akan mempengaruhi faktor pertumbuhan sehingga terjadi disregulasi siklus sel dan merangsang sel normal untuk berproliferasi.
2. Perubahan pada gen supresor tumor : gen ini bertugas sebagai gen *checkpoint* yang mencegah pertumbuhan yang tidak terkontrol. Pada kanker gen ini mengalami mutasi dan tidak dapat menjalankan fungsinya.
3. Perubahan pada gen yang mengatur dari apoptosis: mutasi dari gen yang mengatur apoptosis juga akan menyebabkan pertumbuhan dari kanker.

Akibat dari perubahan onkogen, gen supresor tumor dan apoptosis akan terjadi proses karsinogenesis yang menyebabkan pertumbuhan dari sel kanker.

Ekstrak lengkuas mengandung zat aktif *I- Acetoxychavicol Acetate(ACA)* yang memiliki target molekul NF κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) pada sel tumor. NF κ B diduga menyebabkan pertumbuhan sel tumor melalui beberapa jalur

diantaranya melalui peningkatan proliferasi sel. Disini ACA berperan menghambat NF κ B melalui jalur penghambatan regulator protein siklus sel yaitu Siklin D1 yang berakibat terjadinya hambatan transisi siklus sel dari fase G1 ke S, dengan demikian aktivitas proliferasi sel akan menurun dan sel tumor tidak tumbuh.

3.2 Hipotesis Penelitian

Terdapat pengaruh ekstrak etanol lengkuas terhadap aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mamma mencit C3H.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium, yang bertujuan untuk mempelajari pengaruh perlakuan (manipulasi) pada subjek penelitian kemudian diuji secara empirik (Yanwirasti, 2009)

4.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *true experimental design-post test only controled design group* , yaitu rancangan yang digunakan untuk mengukur efek setelah diberikan perlakuan pada beberapa kelompok (kontrol dan perlakuan) yang dikondisikan secara identik dan telah dikendalikan sebagai variabel yang tidak dikehendaki atau non eksperimental.

Pada kelompok-kelompok tertentu diberikan intervensi sebagai kausa sedangkan kelompok yang lain tidak diberikan intervensi, kemudian dibandingkan efek yang terjadi antara kelompok-kelompok tersebut (Yanwirasti, 2009)

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian meliputi mencit strain C3H yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta.

4.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian merupakan bagian dari populasi penelitian yang memenuhi kriteria inklusi dan kriteria eksklusi. Adapun kriteria inklusi pada penelitian ini adalah:

- a. Mencit betina
- b. Strain C3H
- c. Umur 3 – 4 bulan
- d. Berat badan 15 – 25 gram
- e. Selama observasi 7 hari sebelum perlakuan tidak sakit, aktivitas dan tingkah laku normal.

Sedangkan kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah:

- a. Tidak tumbuh tumor setelah dilakukan inokulasi.
- b. Mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif)
- c. Mencit mati selama perlakuan berlangsung (*drop out*).

4.4 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini berjumlah 32 ekor yang didapatkan dengan menggunakan rumus Federer (Federer, 1955):

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15+3$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Keterangan:

t: jumlah kelompok perlakuan

n: jumlah hewan coba tiap kelompok

Jadi jumlah sampel dalam penelitian ini adalah $4 \times 6 = 24$ ekor, ditambah 4 ekor dengan mempertimbangkan *drop out* sebesar 10%-20%, dan ditambah 4 ekor untuk melihat kepastian pertumbuhan tumor maka jumlah sampel keseluruhan sebanyak 32 ekor.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah ekstrak etanol *Alpinia galanga* (lengkuas) dengan dosis bertingkat 225 mg/kgBB/hari, 450 mg/kgBB/hari dan 675 mg/kgBB/hari.

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah indeks proliferasi sel yang dihitung berdasarkan jumlah ekspresi dari Ki-67

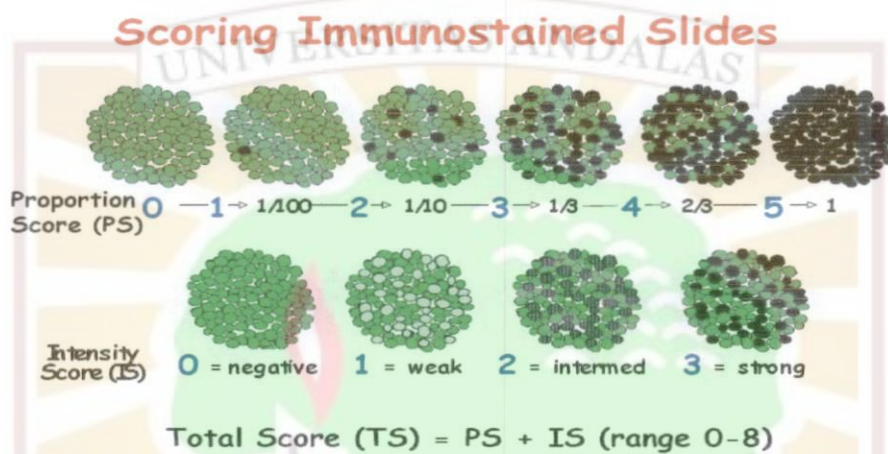
4.6 Definisi Operasional

1. Aktivitas proliferasi sel:

- a) Definisi : adalah jumlah sel yang bertambah banyak,
- b) Cara ukur : dengan menggunakan mikroskop pembesaran 400x, ekspresi proliferasi sel dapat dilihat melalui pemeriksaan imunohistokimia Ki-67 berupa inti sel yang berwarna coklat. Sel dihitung dengan menjumlahkan

proportion scoring dengan *intensity scoring*. Tiap slaid masing-masing dilakukan penilaian sebanyak 5 lapangan pandang.

- c) Alat ukur : menggunakan *Allred scoring*
- d) Hasil ukur: berupa angka (0 sampai dengan 8)
- e) Skala ukur: rasio



Gambar 4.1 *Allred scoring*

2. Ekstrak etanol lengkuas:

- a) Definisi : adalah rimpang lengkuas merah yang diekstraksi dengan menggunakan etanol
- b) Cara ukur : dengan ditakar
- c) Alat ukur: menggunakan gelas ukur
- d) Hasil ukur: berupa kelompok I (225mg), kelompok II (450mg), kelompok III (675mg)
- e) Skala ukur: ordinal

4.7 Bahan dan Alat

4.7.1 Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bahan uji rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) diperoleh dan diekstraksi di bagian Laboratorium Pengujian Mutu Bahan Obat Alam dan Agroindustri di UNDIP . Lengkuas merah segar dengan umur panen 9 bulan.
2. Hewan coba adalah mencit betina strain C3H dengan umur 3-4 bulan dan berat 15-25 gram. Mencit diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
3. Sel tumor Adenokarsinoma mamma diperoleh dari mencit donor.
4. Bahan-bahan untuk penatalaksanaan jaringan, pembuatan sediaan histopatologik dan imunohistokimia.
5. *Monoclonal Rat Anti-Mouse Ki-67 Antigen*, DakoCytomation code No. M 7249.

4.7.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut :

1. Kandang mencit.
2. Sonde lambung untuk memasukkan ekstrak per oral.
3. Seperangkat alat bedah minor.
4. Alat-alat ekstraksi bahan obat sesuai prosedur baku Laboratorium Pengujian Mutu Bahan Obat Alam dan Agroindustri di UNDIP .
5. Alat-alat penatalaksanaan jaringan, pembuatan sediaan histopatologik dan imunohistokimia.

6. Mikroskop cahaya

4.8 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di:

1. Laboratorium Penelitian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas

Indonesia Jakarta, berupa:

- a) Pemeliharaan mencit
- b) Inokulasi tumor pada mencit
- c) Perlakuan pada mencit
- d) Terminasi mencit

2. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

Padang, berupa:

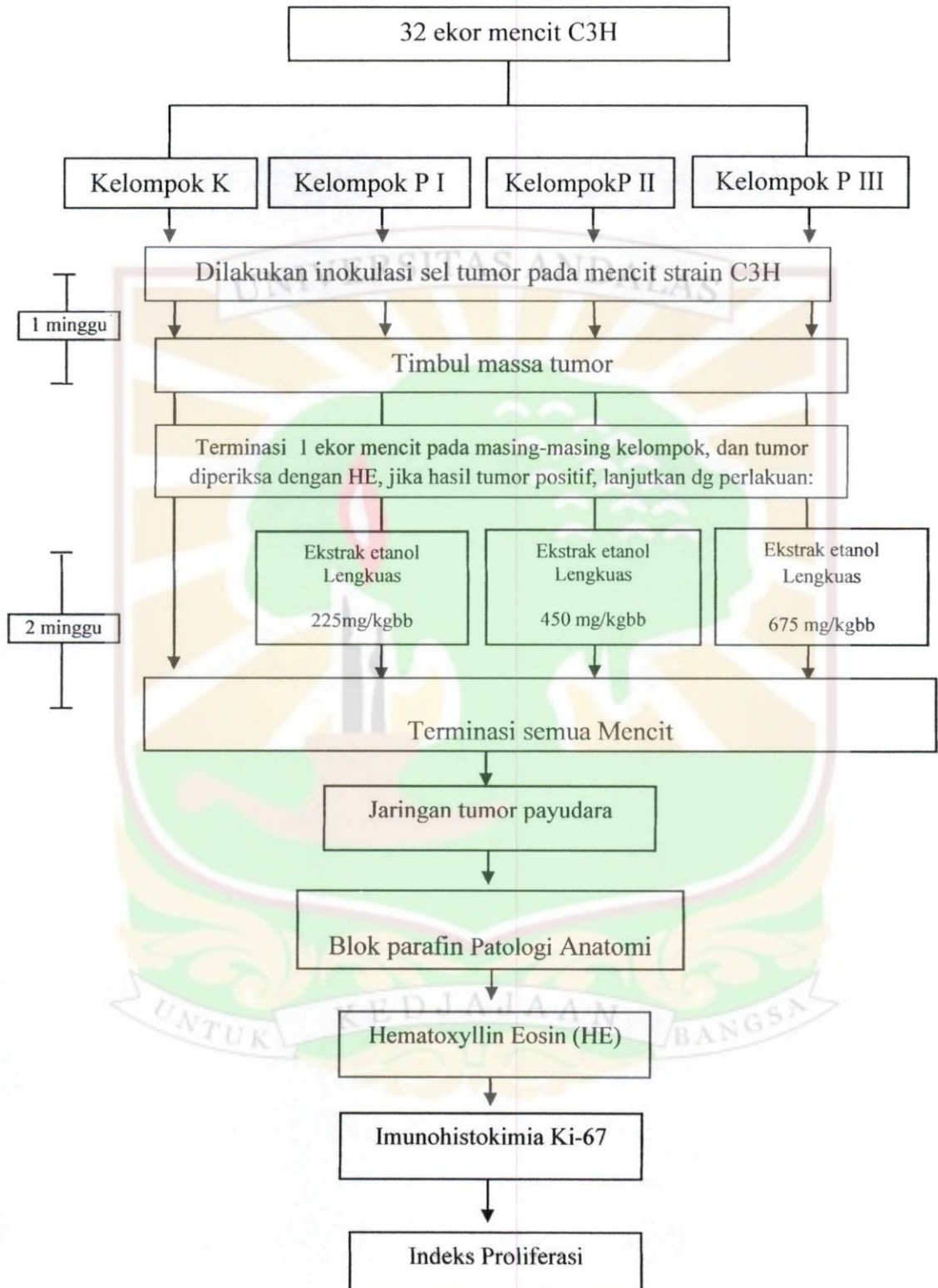
- a) Pewarnaan jaringan dengan HE (*Hematoxilin Eosin*)
- b) Pewarnaan imunohistokimia Ki-67 dan penilaiannya

3. Laboratorium Pengujian Mutu Bahan Obat Alam dan Agroindustri di Undip,

berupa: pembuatan ekstrak etanol lengkuas

Waktu penelitian dilakukan sejak bulan Februari 2012 hingga bulan Februari 2013

4.9 Kerangka Alur Penelitian



4.10 Prosedur Kerja

Tiga puluh dua ekor mencit betina strain C3H dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok Kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2), Perlakuan 3 (P3). Masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor mencit C3H, kemudian dikandangan sesuai kelompok dan pada tiap mencit diberi penomoran dengan memberi tanda pada telinga tiap mencit. Dilakukan penimbangan berat badan semua mencit, kemudian semua mencit dari K, P1, P2 dan P3 dilakukan inokulasi sel tumor mamma. Setelah timbul masa tumor dilakukan pengukuran volume tumor yang terjadi dan terminasi mencit masing-masing 1 ekor setiap kelompok untuk memastikan adanya pertumbuhan tumor dengan menggunakan pemeriksaan histopatologi (HE). Setelah terbukti benar adanya pertumbuhan tumor, selanjutnya mencit diberi perlakuan sebagai berikut:

Kelompok K diberi diet standar selama 2 minggu dan tidak mendapatkan perlakuan (ekstrak etanol lengkuas). P1 diberi diet standar, dan mendapat sonde ekstrak etanol lengkuas 225 mg/kgBB/hari selama 2 minggu. P2 diberi diet standar, mendapat sonde ekstrak etanol lengkuas merah 450 mg/kgBB/hari selama 2 minggu. P3 diberi diet standar, mendapat sonde ekstrak etanol lengkuas merah 675 mg/kgBB/hari selama 2 minggu. Ekstrak etanol lengkuas yang akan diberikan ke mencit terlebih dahulu dilarutkan dengan aquabidest sampai volume kira-kira 0,2 ml.

Berat badan mencit ditimbang saat mulai penelitian, selanjutnya minggu ke I, minggu ke II awal dan minggu ke II akhir sebelum terminasi. Pengukuran volume tumor dimulai 1 minggu setelah inokulasi, minggu ke II awal dan

minggu ke II akhir sebelum terminasi. Setelah masa perlakuan berakhir, semua mencit diterminasi. Cara terminasi memperhatikan prinsip-prinsip yang dinyatakan dalam Deklarasi Helsinki 1975 dan Pedoman Nasional Etik Penelitian Kesehatan (PNEPK), mencit dianestesi dengan ether menurut kelompoknya, selanjutnya mencit diterminasi dengan cara didislokasi servikalnya. Kemudian diambil jaringan tumor dilakukan pengukuran volume tumor. Jaringan tumor diproses menjadi blok parafin, kemudian dibuat preparat untuk pemeriksaan histopatologik dengan pewarnaan jaringan dengan HE. Selanjutnya dilakukan pengecatan imunohistokimia Ki-67.

4.11 Analisis Data

Data yang telah diperoleh meliputi aktivitas proliferasi berupa perbedaan jumlah Ki-67 dari empat kelompok, yaitu kelompok kontrol (K), kelompok P1 yang mendapatkan ekstrak etanol *Alpinia galanga* 225 mg/kgBB/hari, P2 yang mendapatkan ekstrak etanol *Alpinia galanga* 450 mg/kgBB/hari dan P3 yang mendapatkan ekstrak etanol *Alpinia galanga* 675 mg/kgBB/hari. semua data diolah secara statistik dengan menggunakan alat bantu program komputer SPSS.

Data aktivitas proliferasi merupakan skala rasio. Dilakukan analisa deskriptif ditampilkan dalam bentuk mean, median, modus dan simpangan baku, selanjutnya dinilai memiliki sebaran normal atau tidak, dengan menilai histogram, box plot. Selanjutnya dilakukan uji normalitas Kolmogorov Smirnov. Data memiliki distribusi normal dan varian sama dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*, dengan derajat kepercayaan 95%. Bila data terdistribusi normal

kemudian dilakukan uji beda antar kelompok dengan *Post Hoc test* jenis *Bonferroni*

4.12 Persetujuan Etik

Penelitian ini sudah melalui Kaji Etik didepan Tim Komite Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang pada tanggal 6 Agustus 2012 dan dinyatakan lolos Kaji Etik dengan No: 149/KEP/FK/2012.



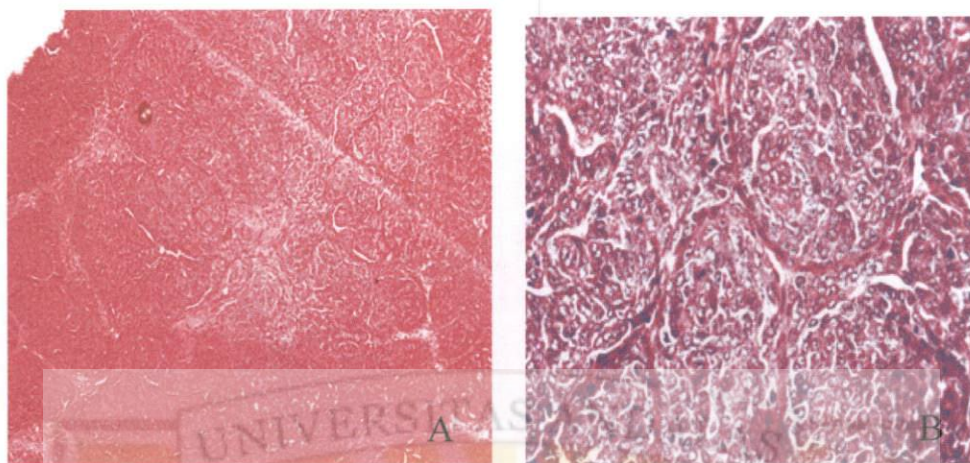
BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Inokulasi Sel Adenokarsinoma Mamma, Berat Badan dan Volume tumor mencit

Pada percobaan ini dilakukan penimbangan berat badan mencit sebelum inokulasi tumor dimana didapatkan berat badan mencit terkecil adalah 17gr dan yang terbesar adalah 25,5gr. Selanjutnya dilakukan inokulasi sel adenokarsinoma mamma pada mencit C3H, dengan cara menyuntikkan 0,2 cc tumor mamma yang berasal dari mencit donor yang telah dicacah dan dibuat bubur tumor kemudian disuntikkan ke bagian axilla kanan secara subkutan. Disini terjadi masa laten sel tumor selama kurang lebih satu minggu dan massa tumor akan timbul pada lokasi suntikan. Pada awal minggu pertama setelah dilakukan inokulasi, sudah timbul massa tumor pada tempat inokulasi dengan volume tumor terkecil adalah $15,2\text{mm}^3$ dan terbesar $33,7\text{mm}^3$.

Masing-masing kandang diambil 1 ekor mencit secara acak dan di terminasi untuk diperiksa sel tumornya melalui pemeriksaan patologi anatomi dengan pewarnaan HE (*Hematoxyllin Eosin*). Dari hasil pemeriksaan seluruh slaid didapatkan positif sel tumor adenokarsinoma (gambar 5.1).

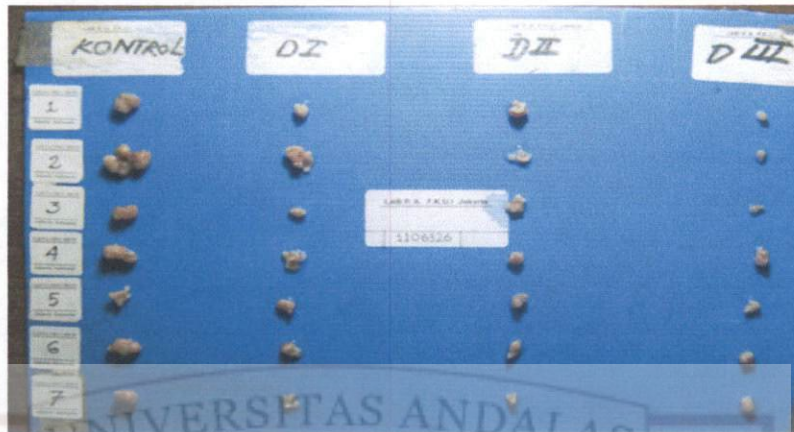


Gambar 5.1 Sel tumor adenokarsinoma mamma mencit dengan pewarnaan HE (*Hematoxyllin Eosin*)

- A. Sel tumor adenokarsinoma mencit, setelah inokulasi tumor 1 minggu, dengan pewarnaan HE(*Hematoxyllin Eosin*), pembesaran 100x
- B. Sel tumor adenokarsinoma mencit, setelah inokulasi tumor 1 minggu , dengan pewarnaan HE(*Hematoxyllin Eosin*) ,pembesaran 400x

Pada saat sebelum terminasi akhir dilakukan pemeriksaan berat badan dan volume tumor mencit. Berat badan mencit yang terkecil sebelum dilakukan terminasi akhir adalah 18,4gr dan terbesar adalah 25,8gr, sedang volume tumor mencit terkecil terdapat pada kelompok P3 yaitu $12,6 \text{ mm}^3$ dan terbesar terdapat di kelompok kontrol yaitu $216,4 \text{ mm}^3$.

Perbandingan besar tumor mencit pada tiap kelompok dapat dilihat pada gambar 5.2



Gambar 5.2 Perbandingan besar tumor mencit tiap kelompok.

5.2 Hasil Pemeriksaan Aktivitas Proliferasi Sel Tumor Dengan Imunohistokimia Ki-67

Setelah terminasi akhir semua mencit, semua sel tumor yang telah diambil dilakukan pemeriksaan histopatologi HE (*Hematoxyllin Eosin*), dan dilanjutkan dengan pemeriksaan imunohistokimia Ki67 (gambar 5.4) untuk memeriksa indeks proliferasi dari masing-masing kelompok. Pemeriksaan Ki-67 dibantu dengan menggunakan mikroskop pembesaran 400x dengan cara menjumlahkan antara *Proportion Score* dan *Intensity Score* dari *Allred Scoring*, selanjutnya dilakukan analisa data dengan program komputer SPSS.

Dari hasil SPSS dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan Kolmogorov Smirnov, didapatkan hasil $p=0,690$ ($p>0,05$) sehingga dapat disimpulkan sebaran data normal, kemudian dilanjutkan dengan uji hipotesis parametrik *Oneway Anova*. Berdasarkan hasil uji *Oneway Anova* terdapat hasil perbedaan yang bermakna $p=0,001$ ($p<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan aktivitas proliferasi diantara kelompok penelitian. Selanjutnya untuk melihat

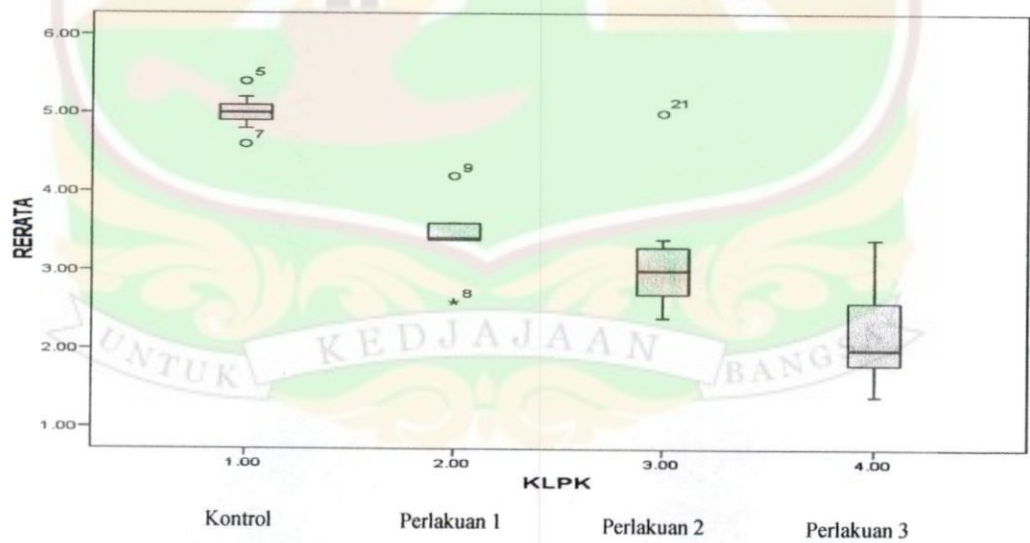


kelompok mana yang memiliki perbedaan aktivitas proliferasi dilanjutkan dengan pemeriksaan *Post Hoc test* yaitu *Bonferroni*.

Tabel 5.1 Rerata aktivitas proliferasi kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan pada mencit

Kelompok	Rerata±SD	Median	Sig
Kontrol	5,00±0,25	5,0	p=0,001
P1	3,46±0,47	3,4	
P2	3,20±0,86	3,0	
P3	2,23±0,69	2,0	

Hasil rerata aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mamma mencit yang tertinggi didapatkan pada kelompok Kontrol yaitu $5,00 \pm 0,25$, diikuti kelompok P1 dengan $3,45 \pm 0,47$, kemudian P2 dengan $3,20 \pm 0,86$ dan terendah adalah kelompok P3 dengan $2,22 \pm 0,69$.



Gambar 5.3. Box Plot median aktivitas proliferasi mencit

Dari hasil *Box plot* median didapatkan angka median tertinggi pada kelompok Kontrol diikuti oleh kelompok P1, kemudian kelompok P2 dan terendah pada kelompok P3.

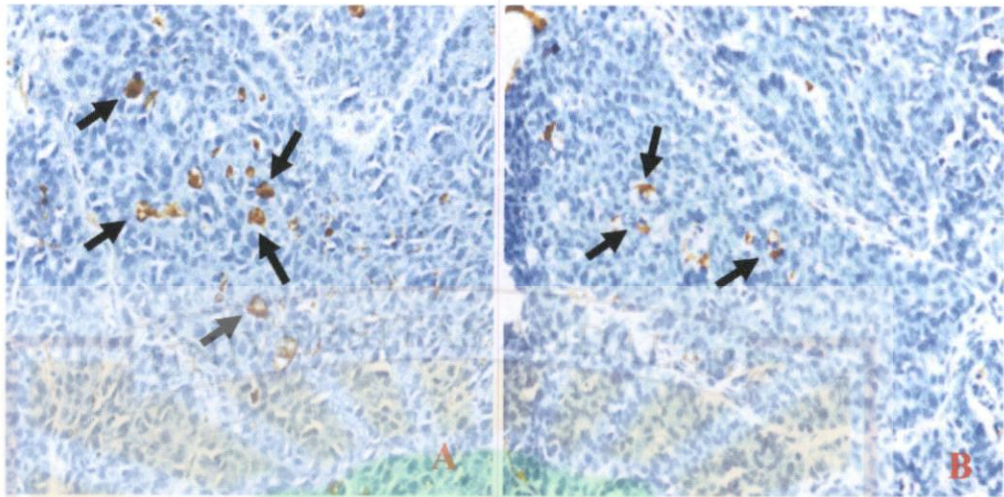
Analisa statistik dari berbagai kelompok dapat dilihat pada tabel 5.2 dengan analisa *Bonferroni*

Tabel 5.2 Aktivitas proliferasi mencit C3H setelah diberi ekstrak etanol lengkuas pada masing-masing kelompok

	Klpk K	Klpk P1	Klpk P2	Klpk P3
Kelompok K		0,001	0,001	0,001
Kelompok P1	0,001		1,000	0,006
Kelompok P2	0,001	1,000		0,042
Kelompok P3	0,001	0,006	0,042	

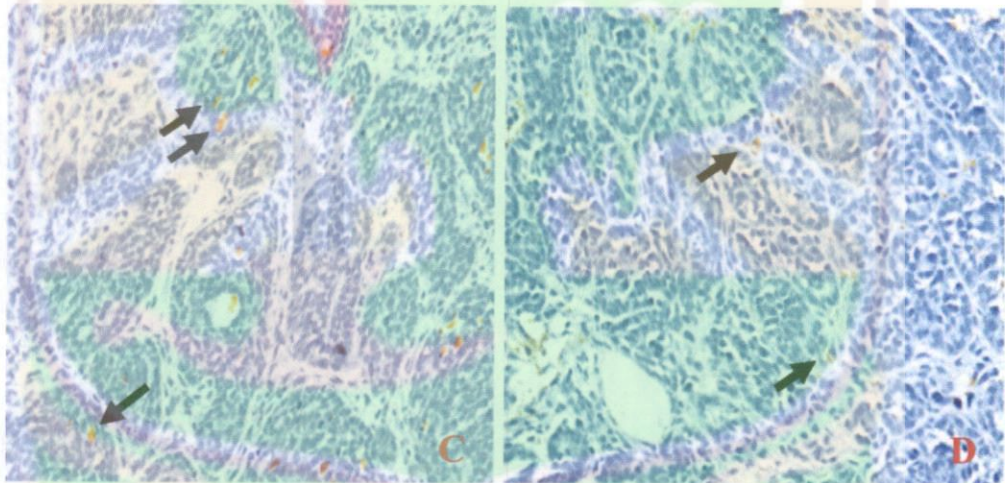
Dari analisa test *Post Hoc Bonferroni* hasil aktivitas proliferasi yang bermakna terdapat pada kelompok Kontrol dengan P1($p=0,001$), kelompok Kontrol dengan P2($p=0,001$), kelompok Kontrol dengan P3($p=0,001$), kelompok P1 dengan kelompok P3 ($P=0,006$), kelompok P2 dengan kelompok P3 ($p=0,042$). Perbedaan yang tidak bermakna terdapat pada kelompok P1 dengan P2 ($p=1,000$).

Hasil imunohistokimia penelitian ini dapat dilihat pada gambar 5.4



Gambar A : Kelompok Kontrol dengan *Allred Score* (2+3=5)

Gambar B : Kelompok Perlakuan 1 dengan *Allred Score* (2+2=4)



Gambar C: Kelompok Perlakuan 2 dengan *Allred Score* (1+2=3)

Gambar D: Kelompok Perlakuan 3 dengan *Allred Score* (1+1=2)

Gambar 5.4 Imunohistokimia Ki-67 pada aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma, berupa warna coklat disekitar inti sel tumor (panah hitam) , pembesaran 400x

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Inokulasi Tumor Mencit

Pada penelitian ini dilakukan eksperimen menggunakan mencit strain C3H karena jenis mencit ini memiliki kecenderungan untuk mendapat keganasan melalui kerentanan genetik dan transmisi virus MMTV (*Mouse Mamary Tumor Virus*) melalui mammae sehingga mudah terjadi proses karsinogenesis. Dengan mempergunakan teknik inokulasi berupa transplantasi sel-sel tumor akan menyebabkan terjadinya transformasi nodular beberapa saat kemudian disertai dengan perkembangan sel-sel tumor. Pada penelitian ini satu minggu setelah inokulasi tumor sudah didapatkan pertumbuhan tumor pada mencit, dimana didapatkan volume tumor terkecil adalah $15,2\text{mm}^3$ dan terbesar $33,7\text{mm}^3$, hal ini dapat dijelaskan bahwa proses tumorigenesis pada masing-masing mencit itu bervariasi dan proses tersebut sangat dipengaruhi oleh daya tahan mencit. Pertumbuhan tumor mencit pada minggu berikutnya sampai menjelang terminasi bervariasi, dimana pada kelompok Kontrol terlihat volume tumor mencit cenderung bertambah besar, sedangkan pada kelompok perlakuan volume tumor cenderung mengecil karena efek dari pemberian ekstrak lengkuas. Berdasarkan literatur Turusov and Mohr (1994) menyatakan bahwa pertumbuhan tumor mamaria pada mencit strain C3H bisa mencapai 2,4 mm setiap minggunya.

6.2 Perlakuan Mencit Dengan Ekstrak Etanol Lengkuas

Dari hasil penelitian didapatkan rerata aktivitas proliferasi terjadi pada semua mencit ,dimana aktivitas tertinggi didapatkan pada kelompok Kontrol (5,00) , diikuti kelompok P1 (3,45), kemudian P2 (3,20) dan terendah pada kelompok P3 (2,22). Pada hasil pengujian antar kelompok didapatkan perbedaan yang bermakna diantara ke 4 kelompok percobaan ($p=0,001$). Aktivitas proliferasi yang bermakna terdapat antara kelompok Kontrol dengan P1 ($p=0,001$) menggunakan dosis ekstrak etanol lengkuas 225mg/kgBB/hari, kelompok Kontrol dengan P2($p=0,001$) menggunakan dosis ekstrak etanol lengkuas 450mg/kgBB/hari ,kelompok Kontrol dengan P3($p=0,001$) menggunakan dosis ekstrak etanol lengkuas 675mg/kgBB/hari, antara kelompok P1 dengan P3 dan antara kelompok P2 dibandingkan kelompok P3. Sedang antara kelompok P1 dengan kelompok P2 tidak didapatkan perbedaan aktivitas proliferasi yang bermakna walaupun secara rerata terdapat penurunan aktivitas proliferasi.

Dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol lengkuas dengan dosis 225mg/kgBB/hari sudah terjadi penurunan aktivitas proliferasi , dan bila dosis dinaikkan hingga 675mg/kgBB/hr terjadi penurunan aktivitas proliferasi yang lebih bermakna secara statistik ,yang sesuai dengan penurunan rerata aktivitas proliferasi.

Lengkuas (*alpinia galanga*) sebagai salah satu tanaman obat memiliki zat aktif ACA yang memiliki potensi untuk menurunkan kejadian kanker dengan cara menurunkan aktivitas proliferasi. Hal ini dapat dijelaskan bahwa sebagian besar dari mediator utama pertumbuhan tumor adalah inflamasi kronik dan NFκB

merupakan salah satu faktor transkripsi inflamasi utama yang berperan dalam pengaturan dari beberapa perkembangan sel tumor. NFκB juga ditemukan pada jaringan tumor dan merupakan target molekul dari beberapa tanaman obat yang memiliki efek anti kanker. Lengkuas dengan kandungan ACA memiliki peran menghambat NFκB melalui jalur penghambatan regulator protein siklus sel yaitu Siklin D1 yang berakibat terjadinya hambatan transisi siklus sel dari fase G1 ke S, dengan demikian aktivitas proliferasi sel akan menurun dan sel tumor tidak tumbuh. (Gautam Sethi et al, 2008; Shishir Shishodia 2004; Bharat B. Aggarwal, 2006).

Beberapa penelitian terdahulu yang menggunakan lengkuas sebagai terapi alternatif anti kanker seperti pada penelitian Hartono (2009) yang menggunakan ekstrak etil asetat lengkuas serta pada penelitian Herla Rusmarilin (2003) yang juga telah membuktikan bahwa ekstrak etil asetat lengkuas ternyata dapat menghambat proliferasi sel kanker dalam kultur baik menggunakan alur sel kanker maupun sel kanker primer manusia. Demikian pula Lee and Houghton (2005) serta Chudiwal et al (2010) juga telah membuktikan khasiat dari ACA sebagai anti kanker terhadap MCF7 (*Michigan Cancer Foundation 7*) pada kanker payudara dan sel COR L23 pada kanker paru.

BAB VII

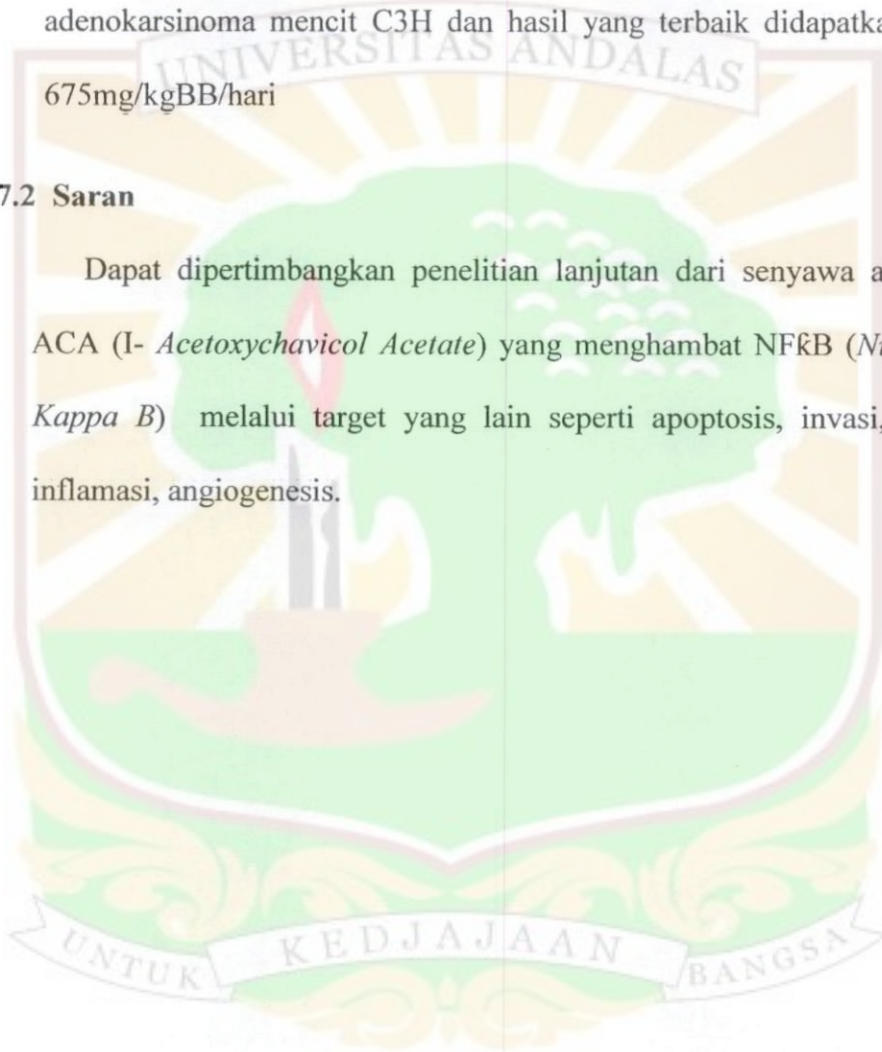
KESIMPULAN DAN SARAN

1.1 Kesimpulan

Pemberian ekstrak etanol lengkuas (*alpinia galanga*) dengan dosis 225mg/kgBB/hari dapat menghambat aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mencit C3H dan hasil yang terbaik didapatkan pada dosis 675mg/kgBB/hari

7.2 Saran

Dapat dipertimbangkan penelitian lanjutan dari senyawa aktif lengkuas ACA (I- *Acetoxychavicol Acetate*) yang menghambat NFκB (*Nuclear Factor Kappa B*) melalui target yang lain seperti apoptosis, invasi, metastasis , inflamasi, angiogenesis.



DAFTAR PUSTAKA

- Ahmedin Jemal, Freddie Bray, Melissa M et al, 2011, Global Cancer Statistics, *Ca Cancer J Clin*: 61:69-90
- Azambuja E de, Cardoso F, G de Castro Jr et al, 2007, Ki-67 as Prognostic marker in early breast cancer: a analysis of published studied involving 12155 patients, *British Journal of Cancer*, (2007) 96, 1504-1513
- Bharat B, Aggarwal, Shishir Shishodia, 2006, Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer, Elsevier, *Biochemical Pharmacology* 71: 1397-1421
- Badan Registrasi Kanker IAPI, Data Histopatologik, Direktorat Jenderal Pelayanan Medik Departemen Kesehatan R.I, Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia, yayasan Kanker Indonesia, 2006
- Callahan R, Smith GH, 2000, MMTV Induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy, and cellular pathway, *Oncogene* (19) :992-1001
- Chudiwal AK, Jain DP, Somani RS, 2010, *Alpinia galangal* wild-an Overview on Phyto pharmacological properties, *Indian Journal of Natural Products and Resources* Vol.I(2);pp.143-149
- Constantinides Paris, 1994, *General Pathobiology*, Appleton & Lange Norwalk Connecticut
- Cragg GM, Simon JE, Jato JG et al, 1993, Drug discovery and development at the National Cancer Institute : Potential for New Pharmaceutical Crops, p.554-560
- Craig Allred D, 2009, Immunohistochemistry in routine clinical testing of prognostics biomarker , utility, validation , problem and solutions

- Dickson RB, Lippman ME, 1988, Cellular and Molecular Biology, Kluwer Academic Publishers, pp.119-165
- Dunn TB, 1958, Morphology mammary tumors in mice, Hoeber Harper NewYork, 2 nd ed,p.38-84
- Federer, W. T., 1955, Experimental Design — Theory and Application, Macmillan Comp., New York
- Gautam Sethi, Bokyung Sung, Bharat B. Aggarwal, 2008, Nuclear Factor κ B activation: From bench to bedside, minireview, Experimental Biology and Medicine, 233:21-31
- Gerdes J, Li L, Schlueter C et al, 1991, Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67, Am J Pathol april, 138(4)
- Hartono NWB, 2009, Pengaruh pemberian ekstrak lengkuas (*alpinia galangal*) terhadap aktivitas proliferasi dan indeks apoptosis pada adenokarsinoma mammae mencit C3H, Tesis
- Hermani, Tri Marwati, Christina Winarti, 2007, Pemilihan Pelarut Pada Pemurnian Ekstrak Lengkuas (*alpinia galanga*) secara ekstraksi, J Pascapanen 4(1);1-8
- Keisuke Ito, Tomonori Nakazato, Ming Ji Xian et al, 2005, 1-Acethoxychavicol Acetate is a novel nuclear factor κ B inhibitor with significant activity against multiple myeloma in vitro and in vivo, Cancer Research, 65:4417-4424
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia,2012, Jika tidak dikendalikan 26 juta orang didunia menderita kanker, available from: <http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1060-jika-tidak-dikendalikan-26-juta-orang-di-dunia-menderita-kanker-.html>
- Kiranmayee Rao, 2011, Development of genetically transformed hairy roots in *alpinia galangal* and production of high value bioactive compounds, Hyderabad India, Thesis

- Kompasiana sharing connecting, Lengkuas, diambil dari <http://kesehatan.kompasiana.com/makanan/2011/06/07/3/371177/lengkuas.html>
- Kumar, Abbas, Fausto, Aster, 2010, Robins and Cotran Pathologic Basis of Disease, eight edition, Saunders elsevier
- Lee CC , Houghton P, 2005, Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer , J Ethnopharmacol, 100(3), 237-43
- Macdonald F , Ford CHJ, A.G ,2004, Molecular Biology of Cancer, Bios Scientific Publisher, Second Edition
- Massaru A, Mari Y, Hiroaki W et al, 1995, Immunohistochemical detection of Ki-67 in replicative smooth muscle cell of rabbit carotid arteries after ballon denudation , Stroke, 26, 2328-32
- Muangnoi P, M lu, J lee et al, 2006, Cytotoxicity, Apoptosis and DNA damage Induced by Alpinia galangal rhizome extract, Planta Med 2007; 73;748-754
- Puay HT, Boon HB, George Y et al, 2005, Immunohistochemical detection of Ki-67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptotis and cell death, Modern Pathol, 18: 374-381
- Ratajczack HV, Sothern RB, Hrushesky JM, 1988, Estrous Influence on Surgical Cure of a Mouse Breast Cancer, J Exp Msd, The Rockefeller University Press, Volume 168, pp 73-83
- Rao Kiranmayee , 2011, Development of genetically transformed hairy roots in alpinia galanga and production of high value bioactive compound, Research and development cell Jawaharlal Nehru Technological Universit Hyderabad India, Thesis
- Rusmarilin H, 2006, Anticancer activity of local alpinia galangal L (SW) rhizome extracts on cancer cell line of human and mice transplanted with primary tumor cell, USU Repository, Disertasi

- Shishir Shisodia, Bharat B. Aggarwal, 2004, Nuclear factor κ B: a friend or a foe in cancer?, *Biochemical Pharmacology*, Elsevier, 68:1071-1080
- Silalahi J, 2006, Antioksidan dalam diet dan Karsinogenesis, *Cermin Dunia Kedokteran* No 153
- Sinaga Erna, 2000, *Alpinia Galanga (L.) Willd*, Pusat Penelitian dan Pengembangan Tumbuhan Obat Unas/P3TO Unas
- Subash C Gupta, Ji Hye Kim, Sahdeo Prasad, 2010, Regulation of Survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and Metastasis of Tumor Cells through modulation of inflammatory pathway by nutraceuticals, *Cancer Metastasis Rev*, DOI 10 1007/s10555-010-9235-2
- Sudarto Pringgoutomo, Sutisna Himawan, Achmad Tjarta, 2006, *Buku Ajar Patologi I (Umum)*, Edisi ke 1, Sagung Seto
- Tavassoli FA, Devilee P, 2003, *WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics Tumour of The Breast and Female Genital Organ*, IARC Press: Lyon-France
- Turusov VS and U. Mohr, 1994, *Pathology of Tumours in Laboratory Animals, Volume II Tumours of the mouse*, second edition, International Agency for Research on Cancer, Lyon France
- Underwood JCE, 2000, *Patologi Umum dan Sistematis, Volume 2*, Edisi 2, Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Urruticoechea Ander, Ian E. Smith, Mitch Dowset, 2005, Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer, *Journal of Clinical Oncology*, Vol 23, No 28 (October), pp:7212-7220
- Yanwirasti, 2009, *Pedoman Penulisan Disertasi Program S3 Ilmu Kedokteran Program Pasca Sarjana Universitas Andalas*

Lampiran 1: Ethical Clearence (Keterangan Lolos Kaji Etik)



KOMITE ETIKA PENELITIAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS ANDALAS

Jl. Perintis Kemerdekaan Padang 25127

Telepon: 0751 31746 Fax : 0751 32838 No. Reg : 036/KNEP/2008

e-mail: fk2unand@pdg.vision.net.id

No: 149/KEP/FK/2012

UNIVERSITAS ANDALAS KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK ETHICAL CLEARANCE

Tim Komite Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang, dalam upaya melindungi hak azazi dan kesejahteraan subjek penelitian kedokteran/kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol penelitian dengan judul:

The Committee of the Research Ethics of the Faculty of Medicine, Andalas University, with regards of the protection of human rights and welfare in medical/health research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

Pengaruh pemberian ekstrak etanol lengkuas (*alpinia galanga*) terhadap aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mamma menci C3H

Nama Peneliti Utama : dr. Susanto Winarko

Name of the Investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

Name of Institution

dan telah menyetujui protokol penelitian tersebut diatas.

and recommended the above research protocol.

Padang, 06 Agustus 2012

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
Dean of Faculty of Medicine Andalas University

Ketua
Chairperson

Dr. dr. Masrul, MSc, Sp.GK
NIP. 1956 1226 1987 101 001



Prof. Dr. dr. Eryati Darwin, PA(K)
NIP. 1953 1109 1982 112 001

**Lampiran 2: Surat Izin Pelaksanaan Penelitian dari Universitas
Indonesia**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
DEPARTEMEN PATOLOGI ANATOMIK**

Jl. Salemba Raya No. 6, Tromolpos 3225 Jakarta 10002
Telp. : 021-3190 5888 Fax. : 021-3193 4465 E-mail : pskanoko@cbn.net.id

**SURAT IZIN PELAKSANAAN PENELITIAN
(SIPP)**

Dengan ini dinyatakan bahwa :

Nama	:	dr. Susanto Winarko
Tempat & Tanggal Lahir	:	Semarang, 17 Oktober 1965
NIM	:	1023113002
Bagian/Instansi asal	:	Patologi Anatomi – Universitas Andalas - Padang
Judul Penelitian	:	" Pengaruh pemberian ekstrak ethanol lengkuas (alpinia Galanga) terhadap aktivitas proliferasi sel Adenocarcino- Ma Mamma Mencit C3H "

Telah memenuhi segala prasyarat administratif kerjasama/bantuan penelitian dengan Departemen Patologi Anatomi FKUI/RS. Dr. Cipto Mangunkusumo.

Untuk itu kepada peneliti tersebut di atas diberi izin untuk memulai pelaksanaan kegiatan penelitian di Departemen Patologi Anatomi FKUI/RS. Dr. Cipto Mangunkusumo dengan jenis pekerjaan administratif/laboratorik berupa :

HE (33 Kasus), Mencit Donor (1 ekor), Mencit Resipien (32 Ekor)

Selama kegiatan penelitian, peneliti akan didampingi oleh Pembimbing dari Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia : Dra. Puspita Eka Wuyung, MS

Teknisi yang membantu : - Tehnisi Lab. Eksperimental.

Jakarta, 22 Oktober 2012

Koordinator Penelitian
Dept. Patologi Anatomi FKUI,

Drs. Kusmardi, MS.
NIP. 19650327 199003 1 001

Tindakan :

1. Peneliti Pendamping.
2. Kepala Laboratorium

Lampiran 3: Surat Keterangan Penyediaan Ekstrak Etanol Lengkuas



UNIVERSITAS DIPONEGORO
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT (LPPM)
Laboratorium Pengujian Mutu Bahan Obat Alam dan Agroindustri
 Kompleks Widya Puraya, Jl Prof Sudarto, Tembalang Semarang 50275 (Ph.
 024-7460038, Fax. 024-7460032, e-mail: LPBOA_undip@yahoo.com)

UNIVERSITAS ANDALAS

SURAT KETRANGAN

Nomor: 02/LPMBOAA.SK/IX/2012

Yang bertandatangan dibawah ini menerangkan dengan sebenarnya bahwa segala hal yang berhubungan dengan penyediaan ekstrak untuk penelitian uji preklinis, a.n.

Nama : dr.Susanto Winarko
 Program : Program S2 Biomedik dan PPDS I Patologi Anatomi Universitas
 Andalas

DILAKUKAN di Laboratorium Pengujian Mutu Bahan Obat Alam dan Agroindustri.
 Kegiatan Penyediaan Ekstrak dengan dosis sesuai pesanan ybs.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Semarang, 10 Oktober 2012

Kepala Bidang Teknis Laboratorium.



Dr. Menny Suzery, MS

UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

Lampiran 4: Inokulasi Sel Adenokarsinoma Mamma

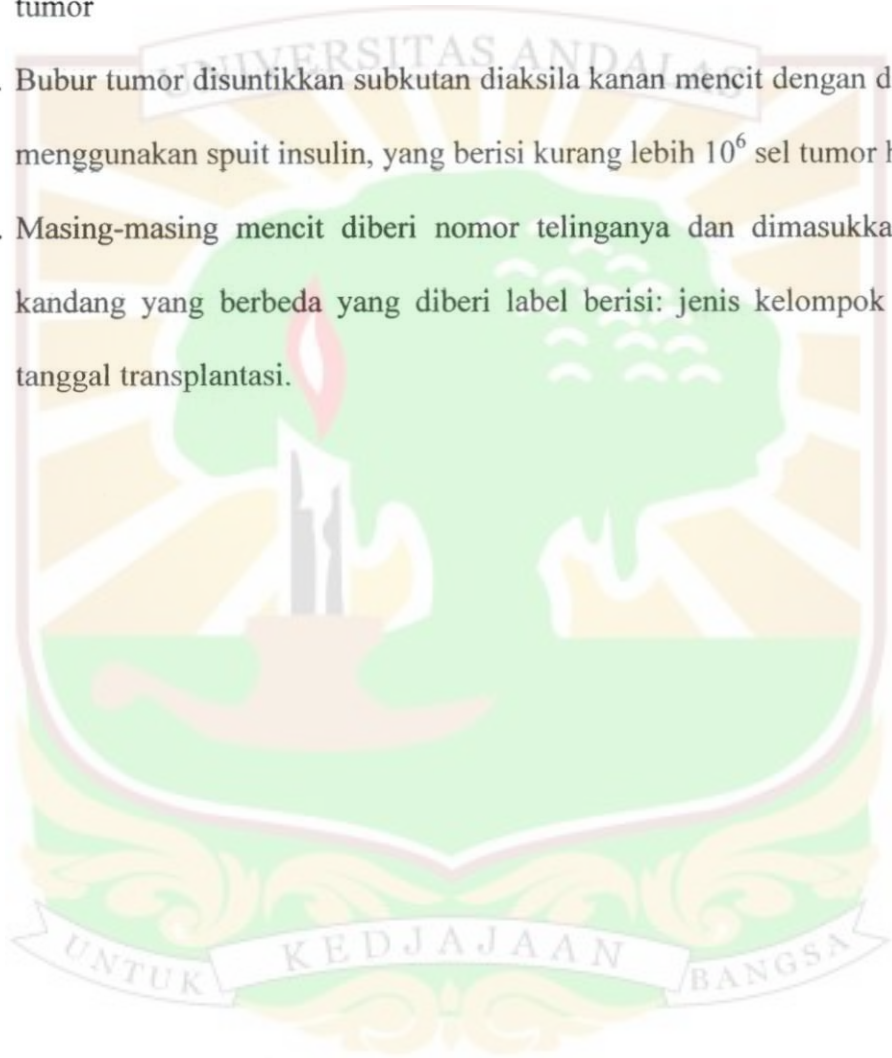
Untuk menumbuhkan sel adenokarsinoma mamma pada hewan coba, digunakan metode inokulasi (penanaman sel adenokarsinoma). Pertumbuhan sel tumor terjadi karena DNA yang telah diekstraksi dari sel tumor dan dipotong-potong menjadi beberapa fragmen, kemudian ditransfer ke mencit melalui *cell line*, selanjutnya digabungkan dengan *genome*, akan menghasilkan sel yang mengalami transformasi karena kehilangan kontak untuk inhibisi. Sel yang mengalami transformasi dapat menghasilkan sel tumor ketika di injeksikan melalui *athymic* mencit. Genome yang dari sel yang mengalami transformasi mengandung onkogen. Terjadinya tumor disebabkan adanya *chromosome translocation*. Translokasi kromosom diidentifikasi sebagai onkogen.

Prosedur inokulasi tumor pada mencit:

1. Mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian diletakkan terlentang pada alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum
2. Kulit dibagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70% , kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus untuk mengeluarkan tumor
3. Tumor diletakkan dicawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es
4. Sebagian tumor diambil dan diperiksa secara histopatologi HE untuk memastikan adanya tumor
5. Amati bentuk dan keadaan tumor, kemudian ambil/potong jaringan tumor yang masih baik yaitu bagian yang tanpa nekrosis sebanyak kira-kira yang

dapat menghasilkan bubur tumor paling sedikit 1 ml dan taruh dicawan petri kecil lainnya. Bersihkan dari jaringan ikat (simpai) jaringan nekrotik dan darah kemudian cacah/potong-potong sampai halus dengan gunting hingga akhirnya terbentuk "bubur tumor" yang partikelnya dapat melewati jarum trokar. Tambahkan garam fisiologis kurang lebih sama banyak dengan volume tumor

6. Bubur tumor disuntikkan subkutan diaksila kanan mencit dengan dosis 0,2 ml menggunakan spuit insulin, yang berisi kurang lebih 10^6 sel tumor hidup.
7. Masing-masing mencit diberi nomor telinganya dan dimasukkan kedalam kandang yang berbeda yang diberi label berisi: jenis kelompok perlakuan, tanggal transplantasi.



Lampiran 5: Pembuatan Ekstrak Etanol *Alpinia Galanga* (rimpang lengkuas)

Dalam menentukan pelarut *Alpinia galanga* untuk mendapatkan *ACA* (*1'* *Acetoxychavicol Acetate*) tertinggi dengan pelarut yang tidak beracun digunakan pelarut ethanol.

Cara pembuatan ekstrak etanol lengkuas (*alpinia galanga*) diperoleh dengan cara:

- Lengkuas merah segar dipilih yang berumur panen 9 bulan, dipotong-potong dan selanjutnya dikeringkan dengan oven 50°C
- Setelah lengkuas menjadi kering kemudian dihaluskan sampai menjadi serbuk. Siapkan 40 gr serbuk lengkuas , bungkus bahan ini dengan kertas saring sehingga bentuknya sesuai dengan alat sokhlet. Kemudian masukkan pelarut etanol 70% dalam labu bulat dan hubungkan dengan alat sokhlet. Dengan pemanasan perlahan, etanol memiliki titik didih 60 °C , lakukan ekstraksi secara kontinyu sekitar 10 kali sirkulasi. Perhatikan benar sirkulasi pendingin, kondensor, agar tidak ada ethanol yang menguap. Kemudian diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* menjadi ekstrak *crude*. Setelah itu dibuat larutan dengan menggunakan aqua bidest menjadi 0,2 ml.

Lampiran 6: Penatalaksanaan Jaringan

1. Jaringan tumor mammae yang telah dipisahkan diukur
2. Masukkan kedalam larutan fiksatif formalin 10% sampai jaringan terfiksasi sempurna (sekitar 24 jam)
3. Jaringan dipotong dalam beberapa blok dan secara acak diambil 2 blok, dimasukkan dalam kaset
4. Proses dehidrasi dengan alkohol bertingkat berurutan alkohol 80% selama 1 jam, kemudian masukkan kedalam alkohol 95% diulang 3 kali, masing-masing tiap 1 jam
5. Proses *clearing* dengan xylol diulang 3 kali, masing-masing 1 jam
6. Impregnasi dalam parafin cair pada temperatur kurang dari 60°C selama 3 kali bergantian masing-masing 1 jam
7. *Embedding* dengan menggunakan histoplast sehingga terbentuk blok parafin kemudian diberi label

Lampiran 7: Pewarnaan Jaringan dengan HE (*Hematoxilin Eosin*)

1. Blok parafin dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3-4 μ , tempelkan pada obyek glas yang telah diolesi albumin gliserin (1:1)
2. Nomori dengan pena kaca sesuai label
3. Panaskan dalam oven selama 10-15 menit, kemudian dinginkan
4. Celupkan dalam xylol I-III, masing-masing selama 5 menit
5. Celupkan dalam alkohol bertingkat berurutan 96%, 80%, 70%, dan 50% masing-masing selama 5 menit
6. Rendam dalam aquadest selama 10 menit
7. Masukkan dalam hematoksin selama 15 menit
8. Bilas dengan air mengalir
9. Celupkan dalam alkohol asam 1-2 celupan
10. Bilas dengan air mengalir
11. Masukkan dalam larutan *bluing solution* selama 5-15 menit
12. Bilas dengan air mengalir
13. Masukkan dalam alkohol 50% I-II masing-masing selama 2 menit dan alkohol 70% I-II masing-masing selama 2 menit
14. Masukkan dalam eosin selama 2 menit
15. Bilas dengan alkohol 70%, 80%, 96% dan alkohol absolut masing-masing 2-3 celupan
16. Dipres dengan kertas saring
17. Masukkan dalam xylol I selama 5 menit, dipres dengan kertas saring

18. Xylol II selama 5 menit, dipres dengan kertas saring
19. Xylol III selama 30 menit , dipres dengan kertas saring
20. Tetesi dengan E-Z *mount*
21. Tutup sediaan dengan *cover glass*, diberi label
22. Sediaan siap dilihat di mikroskop



Lampiran 8: Pewarnaan Proliferasi Sel dengan Ki-67

1. Blok parafin dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3-4 μ , tempelkan pada obyek glas yang telah diolesi poly L- Lysine
2. Deparafinisasi dalam 3 kali xylene masing-masing 5 menit, kemudian alkohol bertingkat dimulai 100% ethanol tiga kali, 95% ethanol dan terakhir dalam air
3. Masukkan dalam 3% hidrogen peroksidase selama 20 menit
4. Dibilas dalam *buffer citrate* (pH 6,0) selama 7 menit dengan temperatur tinggi 600°C, diteruskan dengan temperatur 450°C selama 20 menit, kemudian diamkan selama 10 menit pada suhu kamar. Setelah dingin dicuci dengan PBS selama 3-5 menit sebanyak 3 kali, kemudian slaid ditetesi/diinkubasi dengan normal serum selama 5 menit
5. Pemberian antibody primer/monoklonal rat *Antimouse* Ki-67 Antigen dengan pengenceran 1:25 dalam PBSA minimal 30 menit atau semalam di lemari es
6. Cuci dengan PBS 3-5 menit sebanyak 3 kali
7. Pemberian antibodi sekunder selama 5 menit
8. Cuci dengan PBS 3-5 menit selama 5 menit
9. Pemberian Steptavidin selama 5 menit
10. Cuci dengan PBS 3-5 menit
11. Pengecatan akan tampak setelah dilakukan penambahan DAB (3,3'-diaminobenzidin tetrahidrokloride selama 5 menit pada temperatur ruangan. Oksidasi dari DAB akan membentuk endapan coklat tua yang dideteksi dengan mikroskop. Slaid dicuci dengan air mengalir selama 10-15 menit

12. *Counterstaining* menggunakan hematoksilin selama 4 menit, kemudian cuci dengan air mengalir
13. Dilakukan dehidrasi, *clearing* dan *mounting*, kemudian tutup preparat dengan *cover glass*, sediaan siap dibaca dibawah mikroskop.



Lampiran 9: Laporan Hasil Analisa Statistik

A. Uji Normalitas Data

One sample-Kolmogorov Smirnov test

		RERATA
N		28
Normal Parameters(a,b)	Mean	3.4714
	Std. Deviation	1.16773
Most Extreme Differences	Absolute	.135
	Positive	.135
	Negative	-.122
Kolmogorov-Smirnov Z		.713
Asymp. Sig. (2-tailed)		.690

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Descriptive

Rerata Skor Ki-67

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	7	5.0000	.25820	.09759	4.7612	5.2388	4.60	5.40
Perlakuan1	7	3.4571	.47208	.17843	3.0205	3.8937	2.60	4.20
Perlakuan2	7	3.2000	.86410	.32660	2.4008	3.9992	2.40	5.00
Perlakuan3	7	2.2286	.69693	.26342	1.5840	2.8731	1.40	3.40
Total	28	3.4714	1.16773	.22068	3.0186	3.9242	1.40	5.40

Rerata Skor Ki-67

Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	26.206	3	8.735	16.985	.001
Within Groups	12.343	24	.514		
Total	38.549	27			

B. Uji Beda**Post Hoc test****Multiple Comparisons****Dependent Variable: Rerata Ki-67****Bonferroni**

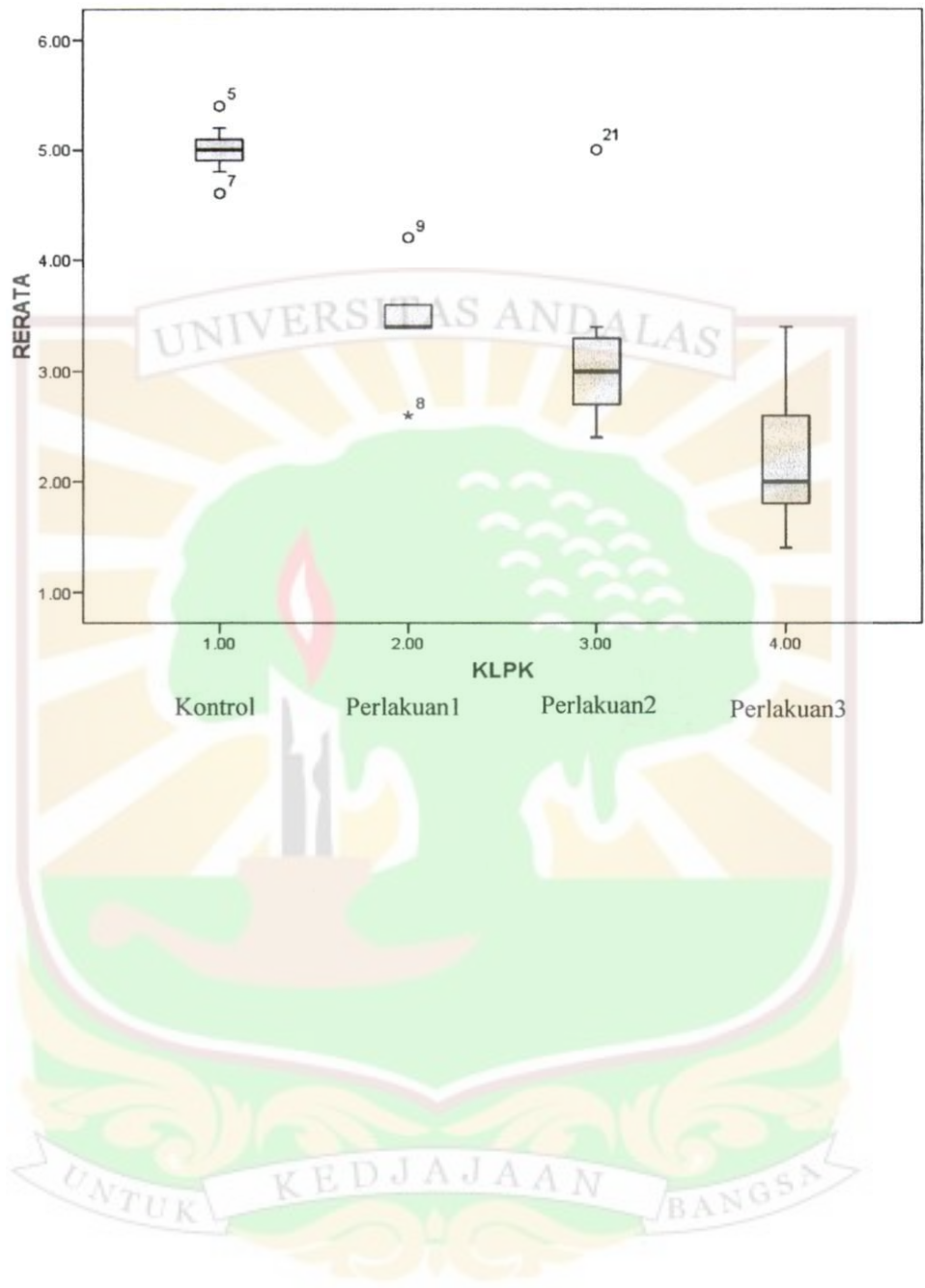
(I) KLPK	(J) KLPK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound
Kontrol	Perlakuan1	1.54286(*)	.32971	.001	.5949	2.4908
	Perlakuan2	1.80000(*)	.32971	.001	.8521	2.7479
	Perlakuan3	2.77143(*)	.32971	.001	1.8235	3.7194
Perlakuan1	Kontrol	-1.54286(*)	.32971	.001	-2.4908	-.5949
	Perlakuan2	.25714	.32971	1.000	-.6908	1.2051
	Perlakuan3	1.22857(*)	.32971	.006	.2806	2.1765
Perlakuan2	Kontrol	-1.80000(*)	.32971	.001	-2.7479	-.8521
	Perlakuan1	-.25714	.32971	1.000	-1.2051	.6908
	Perlakuan3	.97143(*)	.32971	.042	.0235	1.9194
Perlakuan3	Kontrol	-2.77143(*)	.32971	.001	-3.7194	-1.8235
	Perlakuan1	-1.22857(*)	.32971	.006	-2.1765	-.2806
	Perlakuan2	-.97143(*)	.32971	.042	-1.9194	-.0235

* The mean difference is significant at the .05 level.

Descriptives

KLPK			Statistic	Std. Error
RERATA	Kontrol	Mean	5.0000	.09759
		95% Lower Bound	4.7612	
		Confidence Upper Bound	5.2388	
		Interval for Mean	5.0000	
		5% Trimmed Mean	5.0000	
		Median	5.0000	
		Variance	.067	
		Std. Deviation	.25820	
		Minimum	4.60	
		Maximum	5.40	
		Range	.80	
		Interquartile Range	.40	
		Skewness	.000	.794

Perlakuan 1	Kurtosis		.312	1.587
	Mean		3.4571	.17843
	95%	Lower Bound	3.0205	
	Confidence	Upper Bound		
	Interval for Mean		3.8937	
	5% Trimmed Mean		3.4635	
	Median		3.4000	
	Variance		.223	
	Std. Deviation		.47208	
	Minimum		2.60	
	Maximum		4.20	
	Range		1.60	
	Interquartile Range		.20	
	Skewness		-.476	.794
	Kurtosis		2.541	1.587
Perlakuan 2	Mean		3.2000	.32660
	95%	Lower Bound	2.4008	
	Confidence	Upper Bound		
	Interval for Mean		3.9992	
	5% Trimmed Mean		3.1444	
	Median		3.0000	
	Variance		.747	
	Std. Deviation		.86410	
	Minimum		2.40	
	Maximum		5.00	
	Range		2.60	
	Interquartile Range		.80	
	Skewness		1.823	.794
	Kurtosis		3.862	1.587
	Mean		2.2286	.26342
Perlakuan3	95%	Lower Bound	1.5840	
	Confidence	Upper Bound		
	Interval for Mean		2.8731	
	5% Trimmed Mean		2.2095	
	Median		2.0000	
	Variance		.486	
	Std. Deviation		.69693	
	Minimum		1.40	
	Maximum		3.40	
	Range		2.00	
	Interquartile Range		1.20	
	Skewness		.660	.794
	Kurtosis		-.211	1.587



Lampiran 10: Berat badan dan Volume tumor mencit C3H

Kel	n	Berat Badan (gr)				Volume tumor (mm ³)			keterangan
		H0 inokulasi tumor	M1 awal	M2 awal	Pra terminasi	M1 awal	M2 awal	Pra terminasi	
K	1	22,8	23,9	24	24,1	26,6	49,2	182,5	
	2	22,9	22,7	22,8	22,9	16,6	12,9	192,5	
	3	22,9	23,8	24,1	24,3	19,7	39,5	161,8	
	4	24	25	24,8	22,2	23,8	25,1	187,4	
	5	21,2	22	22,3	21	25,8	25,1	216,4	
	6	20,1	20,5	21	21,9	19,8	23,2	149,7	
	7	21,3	23,1	21,8	24,7	30,1	59,2	142,0	
	8	24	24,4	-----	-----	22,8	-----	-----	Terminasi minggu I
P1	1	22,3	24,1	24,2	24,7	17,4	15,0	17,1	
	2	21,4	21,8	21,5	21,6	20,1	61,8	93,6	
	3	24,4	25,1	26,1	26	16,2	35,7	47,8	
	4	22,8	22,2	22,3	22,6	17,8	34,1	52,8	
	5	20,2	21,3	21,2	21	32,5	48,9	61,3	
	6	20,4	22,2	21,8	21,6	15,2	27,7	45,7	
	7	22,1	23,5	23,8	23	33,7	33,7	42,4	
	8	23,3	24,1	-----	-----	20,2	-----	-----	Terminasi minggu I
P2	1	20,1	21,6	21,6	20	25,8	60,5	65,4	
	2	21,1	20,6	20,5	20,5	20,9	19,9	33,1	
	3	22,5	23	23,2	22,3	24,2	32,1	53,6	
	4	25,5	24,5	24,7	25,8	27,6	33,8	51,5	
	5	20,2	21	21,2	20	29,1	53,9	43,6	
	6	20,9	21,2	21,5	20,5	30,9	31,4	63,9	
	7	20	21	21	19,6	20,4	34,9	60,9	
	8	19,9	21,6	-----	-----	29,4	-----	-----	Terminasi minggu I
P3	1	20	18	18	19,1	17,6	18,3	54,1	
	2	21,2	21,2	21,5	22,2	22,3	19,7	25,8	
	3	19,4	17,2	17,2	18,4	18,8	25,3	12,6	
	4	20,5	20,5	20,2	20,2	18,9	40,4	71,6	
	5	21,2	22	22	21,4	29,4	44,0	42,1	
	6	18	18	20,9	21,4	20,8	30,1	59,2	
	7	20,5	20,7	18,2	18,5	29,0	31,7	49,0	
	8	17	17	-----	-----	18,4	-----	-----	Terminasi minggu I

Lampiran 11: Allred Scoring Ki-67 pada mencit C3H

Allred Scoring Ki-67

KELPK	1	2	3	4	5	TOTAL	RERATA
K1	5	5	4	6	5	25	5
K2	5	6	5	5	5	26	5,2
K3	5	5	6	4	5	25	5
K4	6	5	5	6	5	25	5
K5	5	5	6	5	6	27	5,4
K6	5	6	4	4	5	24	4,8
K7	4	4	5	6	4	23	4,6
P1-1	3	0	4	3	3	13	2,6
P1-2	4	5	5	4	3	21	4,2
P1-3	4	3	2	4	4	17	3,4
P1-4	3	4	5	2	4	18	3,6
P1-5	5	4	3	2	4	18	3,6
P1-6	5	3	4	3	2	17	3,4
P1-7	2	5	3	3	4	17	3,4
P2-1	4	3	4	3	3	17	3,4
P2-2	3	3	2	4	1	12	2,4
P2-3	2	4	3	3	3	15	3
P2-4	2	3	3	2	4	14	2,8
P2-5	4	2	2	3	2	13	2,6
P2-6	3	4	5	2	2	16	3,2
P2-7	5	2	2	3	3	15	3
P3-1	0	3	4	2	3	12	2,4
P3-2	3	2	0	0	3	8	1,6
P3-3	0	0	2	2	3	7	1,4
P3-4	4	4	0	4	5	17	3,4
P3-5	2	0	4	2	2	10	2
P3-6	3	4	0	5	2	14	2,8
P3-7	4	3	0	1	2	10	2